



**Maria Graça da Silva  
Pato**

**Degradação de superfícies de diamante em meio  
fisiológico**





**Maria Graça da Silva  
Pato**

**Degradação de superfícies de diamante em meio  
fisiológico**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos – 2º Ciclo, realizada sob a orientação científica do Dr. Miguel Ângelo da Costa Neto, estagiário de Pós-Doutoramento do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro e sob a coorientação científica do Dr. Rui Ramos Ferreira e Silva, Professor Associado do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica, da Universidade de Aveiro.



Para ti, avô.



## **o júri**

Presidente

**Professora Doutora Maria Elisabete Jorge Vieira da Costa**

Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

**Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade**

Investigadora Auxiliar, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade de Coimbra

**Dr. Miguel Ângelo da Costa Neto**

Estagiário de pós-doutoramento no Departamento de Engenharia  
de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro





## **agradecimentos**

Gostaria de agradecer ao Dr. Miguel Neto e ao Prof. Dr. Rui Silva pela orientação e apoio prestados ao longo deste trabalho, sem os quais seria inexequível a realização deste.

Agradeço, igualmente, a todas as pessoas que se disponibilizaram em ajudar-me no decorrer deste trabalho laboratorial, nomeadamente, ao grupo de trabalho do Prof. Dr. Rui Silva, bem como aos demais que se disponibilizaram para realizar as diversas análises laboratoriais essenciais à realização deste trabalho, nomeadamente, ao Dr. António José Fernandes e à Dra. Dulce Helena Teixeira. Agradeço ainda o apoio financeiro do projecto PTDC/CTM-MET/113645/2009 financiado com fundos do FEDER, através do programa COMPETE – Fatores Operacionais para a competitividade, e da Fundação para a Ciência e a Tecnologia - FCT.

Um agradecimento especial aos meus pais e família, que sempre me apoiaram incondicionalmente e incentivaram ao longo deste percurso.

Por fim, um obrigado a todos os meus amigos, os quais estiveram sempre presentes nos bons e maus momentos e, acima de tudo, me apoiaram, igualmente, neste projeto.



**palavras-chave**

Biossensores, diamante micro e nanocristalino, técnica HFCVD, nitreto de silício, aplicações biomédicas

**resumo**

No presente trabalho foram desenvolvidas superfícies de diamante, dopadas com boro, através da técnica de deposição química em fase de vapor assistida por filamento quente (HFCVD), num substrato cerâmico de nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ). Com estas amostras procurou-se estudar a degradação das superfícies de diamante quando em contacto com um fluido fisiológico, em regime estático e dinâmico. Este conhecimento é essencial para a implementação das superfícies de diamante em biossensores implantáveis. Assim, estas superfícies foram imersas numa solução fisiológica de SBF (*simulated body fluid*) com duas concentrações da proteína BSA (*bovine serum albumin*), durante diversos períodos (10, 20 e 30 dias). Os resultados permitiram concluir que as amostras que apresentam uma maior tendência para a adsorção de espécies iónicas à superfície foram aquelas que possuem uma maior rugosidade, bem como maior grau de oxidação. Contudo, foi possível constatar que a rugosidade não exerce uma grande influência na degradação das superfícies dos filmes. Por outro lado, a presença de grupos funcionais na superfície é decisiva, influenciando fortemente quer a adesão de proteínas quer a deposição de espécies iónicas. Relativamente aos regimes em estudo, foi possível concluir que as superfícies de diamante imersas na solução em regime dinâmico apresentam uma menor tendência para a adsorção da proteína BSA, bem como para a deposição de espécies iónicas. Por fim, as medidas de resistência elétrica efetuadas antes e após os ensaios de imersão demonstraram a existência de alterações ao nível da condutividade superficial de algumas amostras. Conclui-se, assim, que esta modificação ocorre devido à deposição de elementos com carga nas superfícies. Esta situação demonstra, efetivamente, que as superfícies MCD e NCD dopadas com boro e desenvolvidas neste trabalho não apresentam características bio-inertes, o que contraria estudos anteriormente realizados.

**keywords**

Biosensors, micro and nanocrystalline diamond, HFCVD technique, silicon nitride, biomedical applications

**abstract**

In the present work, boron doped diamond surfaces, obtained by the hot filament chemical vapor deposition (HFCVD) technique, were grown on silicon nitride ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) ceramic substrates. With these samples, we have studied the degradation of diamond surfaces upon contact with a physiological fluid, in static and dynamic regime. This knowledge is essential for the implementation of diamond surfaces in implantable biosensors. These surfaces were then immersed in a SBF (simulated body fluid) physiological solution with two BSA (bovine serum albumin) protein concentrations for different periods (10, 20 and 30 days). The results have showed that diamond surfaces with greater tendency for adsorption of ionic species at the surface are those having higher roughness as well as higher oxidation degree. However, it was found that the roughness does not exert a major influence on the surface degradation. On the other hand, the presence of functional groups on the surface is decisive, strongly influencing the adherence of proteins and the deposition of ionic species. Regarding the studied regimes, it was concluded that the diamond surfaces immersed in the solution in dynamic regime show a lower tendency for adsorption of BSA protein as well as deposition of ionic species. Finally, the performed electrical resistance measurements, done before and after the immersion tests, demonstrated significant changes of the surface conductivity of some samples. It is then concluded, that these changes mainly occurs due to the deposition of charged elements on the surface. This situation demonstrates effectively that the boron doped MCD and NCD surfaces developed in this work do not exhibit bio-inert characteristics as previously asserted in various studies.

# Índice

Lista de Figuras .....	I
Lista de tabelas .....	IV
Abreviaturas .....	V
Introdução .....	1
Capítulo I - Revisão Bibliográfica .....	5
1. Sistema Circulatório .....	6
2. Proteínas .....	10
3. Biocompatibilidade .....	11
4. Biossensor .....	12
5. Diamante .....	14
5.1. Propriedades do diamante .....	14
5.2. Filmes de diamante CVD .....	15
6. Técnica de deposição química em fase de vapor - CVD .....	16
6.1. Nucleação e crescimento dos filmes de diamante .....	19
6.1.1. Nucleação .....	19
6.1.2. Crescimento .....	20
7. Substrato à base de Nitreto de Silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) .....	21
8. Biossensores de diamante CVD .....	22
9. Enquadramento do tema .....	22
Capítulo II - Procedimento e técnicas experimentais .....	25
1. Produção dos substratos de Nitreto de Silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) .....	26
2. Deposição de Diamante .....	26
2.1. Preparação dos substratos de Nitreto de Silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) .....	26
2.2. Reator HFCVD .....	27
2.3. Deposição dos filmes de diamante CVD .....	29
3. Interação das amostras com uma solução fisiológica – testes in vitro .....	31
3.1. Preparação da solução fisiológica .....	31

3.2.	Estudos de Imersão .....	33
4.	Técnicas de caracterização utilizadas .....	35
4.1.	Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)/ Espetrometria de energia dispersiva (EDS) .....	35
4.2.	Molhabilidade .....	36
4.3.	Espetroscopia Raman .....	37
4.4.	Difração de Raios-X (DRX) .....	38
4.5.	Espetroscopia de Infravermelhos por transformada de Fourier – FTIR .....	39
4.6.	Microscopia de força atômica (AFM) .....	40
4.7.	Medidas elétricas .....	40
	Capítulo III - Resultados e Discussão .....	43
1.	Caracterização inicial das amostras .....	44
1.1.	Caracterização morfológica e microestrutural .....	44
1.1.1.	Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) .....	44
1.1.2.	Difração de Raios-X (DRX) .....	46
1.1.3.	Espetroscopia de Refletância .....	48
1.1.4.	Espetroscopia Raman .....	50
1.2.	Caracterização superficial .....	53
1.2.1.	Microscopia de força atômica (AFM) .....	53
1.2.2.	Molhabilidade .....	55
1.2.3.	Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	57
2.	Caracterização das amostras após imersão na solução fisiológica I .....	61
2.1.	Caracterização superficial .....	62
2.1.1.	Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) .....	62
2.1.2.	Espetrometria de energia dispersiva (EDS) .....	63
2.1.3.	Molhabilidade .....	66
2.1.4.	Espetroscopia Raman .....	69
2.1.5.	Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	71
3.	Caracterização das amostras após imersão na solução fisiológica II .....	74
3.1.	Caracterização superficial .....	75

3.1.1.	Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) .....	75
3.1.2.	Espetrometria de energia dispersiva (EDS).....	75
3.1.3.	Molhabilidade .....	79
3.1.4.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	81
3.1.5.	Caracterização elétrica .....	84
Capítulo IV - Conclusões e trabalho futuro .....		87
Bibliografia.....		91

## Lista de Figuras

Figura 1 - Figura ilustrativa dos diversos componentes que constituem o sangue [Adaptado de 2].	7
Figura 2 - Figura ilustrativa dos vasos sanguíneos que compõem a circulação sanguínea [Adaptado de 1].	8
Figura 3 - Figura ilustrativa da pressão média arterial ao longo do sistema cardiovascular [Adaptado de 2].	8
Figura 4 - Figura ilustrativa da relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo e a área total da secção transversal nos diversos vasos sanguíneos [Adaptado de 2].	9
Figura 5 - Figura ilustrativa da estrutura de um aminoácido [Adaptado de 6].	10
Figura 6 - Figura ilustrativa dos componentes constituintes de um biossensor [Adaptado de 17].	13
Figura 7 - Esquema ilustrativo das diversas etapas da técnica CVD durante a deposição do filme de diamante [adaptado de 34].	17
Figura 8 - Esquema ilustrativo do revestimento de substratos pela técnica HFCVD [Adaptado de 25].	18
Figura 9 - Figura ilustrativa do processo HFCVD para os filmes de diamante [Adaptado de 47].	20
Figura 10 - Figura ilustrativa do reator de HFCVD utilizado para a deposição de filmes de BDD nos substratos de $\text{Si}_3\text{N}_4$ .	28
Figura 11 - Figura ilustrativa do borbulhador utilizado na deposição de filmes de diamante dopados com boro pela técnica HFCVD.	29
Figura 12 - Figura ilustrativa dos filamentos de tungsténio utilizados para a deposição dos filmes de diamante dopados com boro pela técnica HFCVD.	29
Figura 13 - Figura ilustrativa do suporte em teflon.	33
Figura 14 - Figura ilustrativa do suporte em teflon e os respetivos compartimentos herméticos com as amostras imersas na solução SBF+BSA. A – compartimento referente	



às amostras no fluido em regime estático; B - compartimento referente às amostras no fluido em regime dinâmico.....	34
Figura 15 - Figura ilustrativa do sistema preparado para a colocação das diversas amostras na solução SBF+BSA em regime estático (1) e em regime dinâmico (2). A – Vista de frente; B – Vista de topo.....	34
Figura 16 - Figura ilustrativa da medição do ângulo de contacto ( $\theta$ ).....	36
Figura 17 - Figura ilustrativa dos valores do ângulo de contacto $\theta$ . ....	37
Figura 18 - Esquema do circuito montado para a medição elétrica das amostras. ....	41
Figura 19 – Micrografias de SEM da superfície de crescimento das amostras A a F. ....	45
Figura 20 – A) Difractogramas das amostras A a F. SN – Nitreto de silício; D – Diamante. B) Difractogramas referente ao plano (111) do diamante das amostras A a F.....	46
Figura 21 - Espectros Raman obtidos a partir da superfície das amostras A a F. ....	51
Figura 22 - Figura ilustrativa do gráfico de ajuste realizado aos picos presentes nos espectros Raman das amostras A a F.....	52
Figura 23 - Imagens de AFM obtidas para as amostras A a F.....	54
Figura 24 - Ângulos de contacto das amostras A a F obtidos 30'' após o contacto da micro gota de água com a superfície.....	56
Figura 25 – Gráfico dos ângulos de contacto das amostras A a F obtidos 30'' após o contacto da micro gota de água com a superfície. ....	56
Figura 26 – Gráficos dos espectros FTIR típicos das amostras A a F.....	58
Figura 27 - Figura ilustrativa dos ajustes realizados às bandas presentes nos espectros FTIR das amostras A, C e E.....	59
Figura 28 - Micrografias de SEM das amostras A', C', D', E' e F' após a imersão, em regime estático, na solução fisiológica I. ....	64
Figura 29 - Micrografias de SEM das amostras A, C, D, E e F após a imersão, em regime dinâmico, na solução fisiológica I. ....	65
Figura 30 - Espectros de EDS das amostras C/C' após os 30 dias de contacto com a solução fisiológica I em regime dinâmico e em regime estático, respetivamente. ....	66

Figura 31 - Gráfico dos ângulos de contacto e respetiva variação absoluta obtidos para as várias amostras (A' a F'), após 30 dias de imersão na solução fisiológica I, em regime estático. ....	67
Figura 32 – Gráfico dos ângulos de contacto e respetiva variação absoluta obtidos para as várias amostras (A a F), após 30 dias de imersão na solução fisiológica I, em regime dinâmico. ....	68
Figura 33- Espectros obtidos por Espetroscopia Raman, em regime estático e em regime dinâmico, após 30 dias de imersão na solução fisiológica I. ....	70
Figura 34 - Gráficos FTIR referentes às amostras A', C', D', E' e F' após imersão, em regime estático, na solução fisiológica I. ....	72
Figura 35 - Gráficos de FTIR referentes às amostras A, C, D, E e F após imersão, em regime dinâmico, na solução fisiológica I. ....	73
Figura 36 - Figura ilustrativa das micrografias de SEM representativas das amostras MCD e NCD após a imersão destas na solução fisiológica II, em regime estático. ....	76
Figura 37 - Gráficos dos espectros de EDS das amostras submetidas à solução fisiológica II, durante 10 dias. ....	77
Figura 38 - Gráfico dos espectros de EDS das amostras submetidas à solução fisiológica II, durante 20 dias. ....	78
Figura 39 - Gráfico ilustrativo da variação absoluta dos ângulos de contacto obtida para as várias amostras (A' a F'), após 10 dias de imersão na solução fisiológica II. SF I – Solução fisiológica I; SF II – Solução fisiológica II. ....	79
Figura 40 - Gráfico ilustrativo da variação absoluta dos ângulos de contacto obtida para as várias amostras (A a F), após 20 dias de imersão na solução fisiológica II. SF I – Solução fisiológica I; SF II – Solução fisiológica II. ....	80
Figura 41 – Gráficos FTIR referentes às amostras A'/A, C'/C, D'/D, E'/E e F'/F, após os ensaios de imersão de 10 e 20 dias na solução fisiológica II. ....	83
Figura 42 - Figura ilustrativa da associação de resistências em paralelo. ....	85

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Tabela ilustrativa da área total da secção transversal e da velocidade média do sangue dos principais vasos sanguíneos [Adaptado de 2]. .....	10
Tabela 2 – Tabela ilustrativa das principais propriedades do diamante [27]. .....	15
Tabela 3 - Tabela ilustrativa das principais propriedades do nitreto de silício [adaptado de 54]. .....	22
Tabela 4 - Tabela ilustrativa da variação dos parâmetros de deposição. ....	30
Tabela 5 - Tabela ilustrativa dos vários reagentes utilizados, pureza e quantidades empregadas na preparação de 1000 ml da solução fisiológica SBF. * HEPES - ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil) etanosulfónico; **O reagente HEPES foi, previamente, dissolvido em 100 ml de água desionizada [Adaptado de 60]. .....	32
Tabela 6 – Comparação entre a composição química do plasma sanguíneo e a composição química do fluido fisiológico SBF [Adaptada de 60]. .....	33
Tabela 7 - Principais planos DRX do diamante [30]: .....	39
Tabela 8 - Tamanho médio de cristalite das amostras A a F, obtidos por LIBAD. ....	48
Tabela 9 – Espessura obtida para os filmes de diamante dopados com boro. * - Não foi possível realizar a medição. ....	49
Tabela 10 - Tabela ilustrativa dos valores de FOM obtidos para os dois conjuntos de amostras. ....	53
Tabela 11 - Tabela ilustrativa dos valores de rugosidade obtidos para as amostras A a F. ....	54
Tabela 12 - Tabela ilustrativa dos valores de resistência elétrica (inicial, após 30+10 e 30+20 dias de imersão) das amostras em estudo. ....	84

## Abreviaturas

BDD – diamante dopado com boro

HFCVD – deposição química em fase de vapor assistida por filamento quente

CVD - deposição química em fase de vapor

HPHT – elevada pressão e elevada temperatura

MCD – microcristalino

NCD – nanocristalino

UNCD – diamante ultra-nanocristalino

$\text{Si}_3\text{N}_4$  - nitreto de silício

$\text{CH}_4$  – metano

$\text{Y}_2\text{O}_3$  – óxido de ítrio

$\text{Al}_2\text{O}_3$  – óxido de alumínio

$\text{B}_2\text{O}_3$  – óxido de boro

$\text{H}_2$  – hidrogénio molecular

H – hidrogénio atómico

Ar – árgon

P – pressão

SBF – fluido corporal simulado

BSA - albumina de soro bovino

DC - débito cardíaco

$\text{C}\alpha$  - carbono alfa

FCC – cúbica de faces centradas

GOX – glicose oxidase

UV – radiação ultravioleta

IV - radiação infravermelha

FOM – figura de mérito

SEM - microscopia eletrónica de varrimento

EDS – espectroscopia de energia dispersiva

FTIR – espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

DRX – difração de Raios-X

AFM – microscopia de força atômica

## **Introdução**

---

Torna-se cada vez mais urgente implantar dispositivos artificiais no corpo humano, não só em virtude da necessidade de reparar algumas funções biológicas danificadas, como também para monitorização das mesmas. Assim, a indústria de dispositivos médicos procura constantemente encontrar novas soluções e desenvolver novos materiais biologicamente compatíveis com o tecido vivo.

Os biossensores são, atualmente, um importante dispositivo analítico no que ao diagnóstico médico se refere. Estes são constituídos por um elemento bioquímico ou biológico, o qual tem como principal função reconhecer o analíto alvo e imobilizar o correspondente material biológico na sua superfície. Este componente encontra-se ligado a uma unidade de conversão de sinal (transdutor físico-químico), o qual converte o respetivo sinal bioquímico em sinais elétricos mensuráveis.

O diamante é um material extremamente atrativo para aplicações nas áreas da biomedicina e biotecnologia, em virtude das suas singulares propriedades físicas, químicas e biológicas. O diamante é conhecido por ser um excelente isolador elétrico, apresentando uma banda proibida bastante larga, de cerca de 5,45 eV. Contudo, a introdução de dopantes na sua estrutura cristalina pode originar um semicondutor do *tipo-p* ou do *tipo-n*. O boro é o elemento mais eficaz na produção de diamante semicondutor do *tipo-p*. Os filmes de diamante dopados com boro (BDD) são importantes para aplicações sensoriais eletroquímicas e biológicas, uma vez que apresentam uma excelente biocompatibilidade, elevada estabilidade eletroquímica e, ainda, uma boa condutividade elétrica.

A utilização de superfícies de diamante semicondutor em biossensores implantáveis no corpo humano impõe que estas, para além de biocompatíveis, sejam também bio-inertes. Significa isto que, quando em contacto com o meio fisiológico, as superfícies de diamante não devem fomentar a adesão de proteínas e a precipitação de determinados compostos biológicos, os quais podem influenciar o desempenho do biossensor, bloqueando, prematuramente, a atividade da entidade bioquímica presente na sua superfície.

Relativamente ao substrato, os cerâmicos que têm por base o nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) apresentam-se como um excelente material para a deposição de filmes de

diamante, uma vez que possuem uma excelente biocompatibilidade, reconhecidas propriedades bio-inertes, elevada afinidade e, ainda, um coeficiente de expansão térmica bastante próximo ao do diamante.

A técnica de deposição química em fase de vapor assistida por filamento quente (HFCVD – *hot filament chemical vapour deposition*) é uma das técnicas mais utilizadas para a deposição de filmes de diamante CVD. Este processo apresenta diversas vantagens, nomeadamente, baixo custo, grande área de deposição, fácil manuseamento, bem como a possibilidade de depositar em formas mais ou menos complexas.

Neste trabalho, desenvolveram-se diversas superfícies de diamante utilizando um reator HFCVD em substratos eletricamente isoladores de  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Procurou-se conhecer a degradação das superfícies de diamante quando em contacto com um fluido fisiológico que simula o plasma sanguíneo (SBF – *simulated body fluid*). A partir dos resultados obtidos será possível identificar as superfícies que apresentam um maior potencial passível de poderem vir a ser utilizadas em biossensores colocados em contacto com o plasma sanguíneo.

Este trabalho encontra-se dividido da seguinte forma:

- No capítulo I é feita uma revisão bibliográfica aos conteúdos mais relevantes no que respeita à deposição de filmes de diamante pela técnica HFCVD, fazendo-se, igualmente, uma breve alusão a temas como a circulação sanguínea, proteínas e biossensores;
- O capítulo II é dedicado à apresentação do procedimento experimental desenvolvido ao longo deste trabalho laboratorial;
- No capítulo III é realizada uma apresentação, bem como discussão dos resultados obtidos neste trabalho;
- Por fim, no capítulo IV são apresentadas as principais conclusões e sugerido um trabalho futuro.





## **Capítulo I**

---

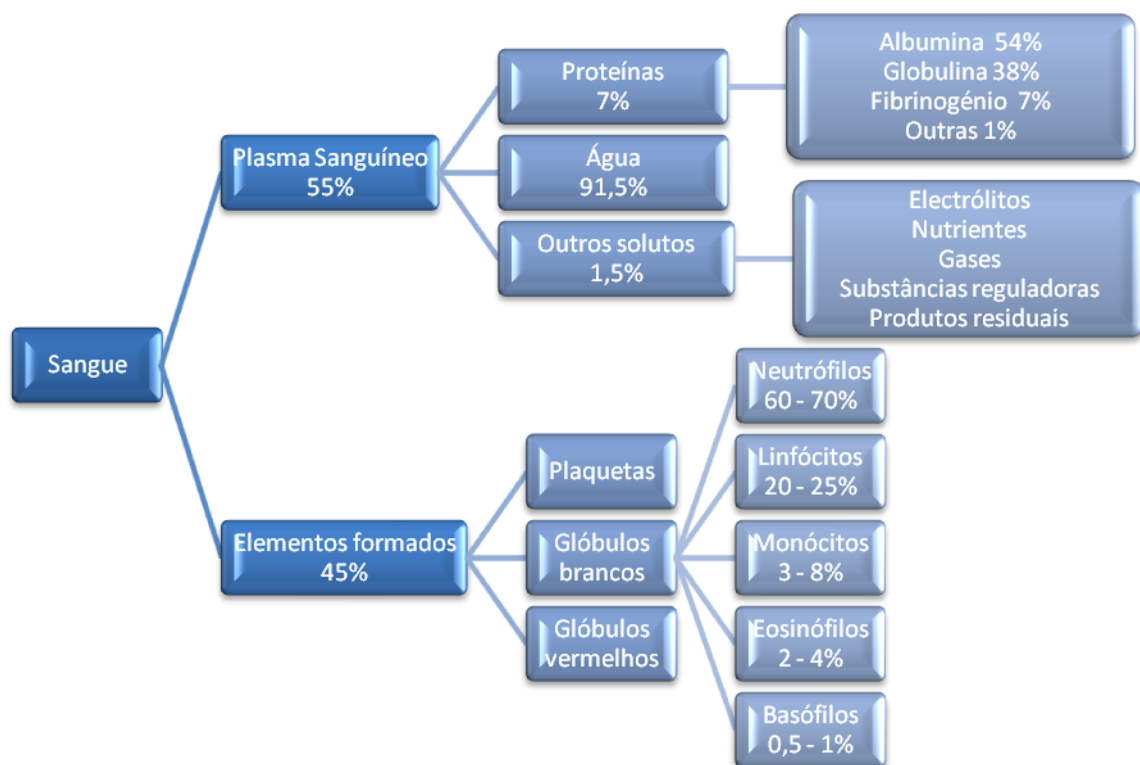
### **Revisão Bibliográfica**

Tendo em conta que o presente trabalho tem como principal objetivo conhecer a degradação das superfícies de diamante quando colocadas em contacto com um fluido fisiológico que simula o plasma sanguíneo, torna-se importante fazer uma breve revisão bibliográfica acerca do sistema circulatório, nomeadamente, principais componentes, funções e sua hemodinâmica. Paralelamente a isto será realizada, tal como já foi referido, uma abordagem ao conceito “proteína”, “biocompatibilidade”, “biossensor”, bem como assuntos importantes relacionados com a deposição de filmes de diamante pela técnica HFCVD.

## **1. Sistema Circulatório**

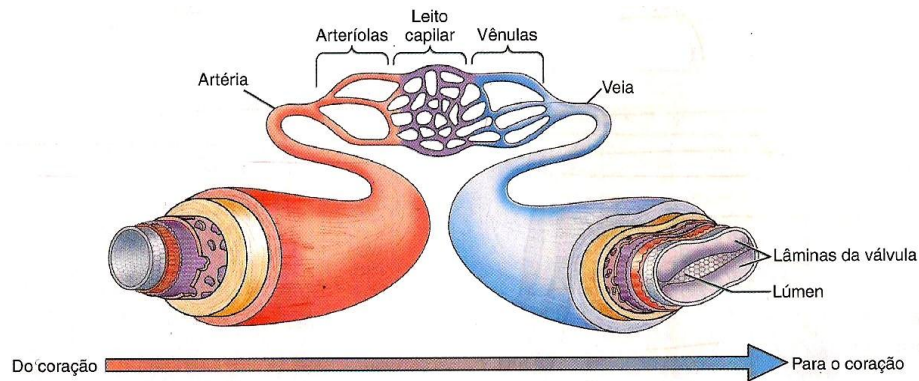
O sangue é um tecido conjuntivo líquido que contribui para a homeostase (regulação das condições internas do corpo humano, de forma a manter o seu equilíbrio dinâmico), uma vez que realiza o transporte de diversos componentes, tais como, oxigénio, dióxido de carbono, nutrientes e hormonas de e para as células do corpo humano. O sangue auxilia, igualmente, na regulação do pH e da temperatura corporal, proporcionando, ainda, proteção contra agentes estranhos ao organismo por meio de processos como fagocitose e produção de anticorpos [1, 2].

O sangue é constituído por plasma sanguíneo (líquido aquoso extracelular que contém substâncias dissolvidas) e por outros elementos, nomeadamente, eritrócitos, leucócitos e plaquetas (figura 1) [2].



**Figura 1** - Figura ilustrativa dos diversos componentes que constituem o sangue [Adaptado de 2].

O sistema circulatório é constituído pelo coração e por um conjunto de vasos sanguíneos (artérias, arteríolas, capilares, vénulas e veias), os quais formam uma rede de transporte. O coração tem como principal função bombear o sangue ao longo do extenso sistema de vasos sanguíneos do corpo humano. O sangue sai do coração a uma elevada pressão e é distribuído ao longo do corpo por meio de um sistema ramificado de artérias de parede espessa [1, 3]. Por fim, as arteríolas entregam sangue oxigenado para os capilares, os quais formam o leito capilar onde ocorre, em virtude da sua parede fina, a troca de nutrientes, oxigénio e substâncias residuais com os tecidos do corpo. Por outro lado, o sangue proveniente do leito capilar penetra nas vénulas de parede fina. Estas, por sua vez, juntam-se para formar vasos sanguíneos progressivamente maiores denominados de veias, sendo os responsáveis pelo transporte do sangue dos tecidos de volta para o coração [1]. A figura 2 ilustra os diversos vasos sanguíneos que compõem a circulação sanguínea.

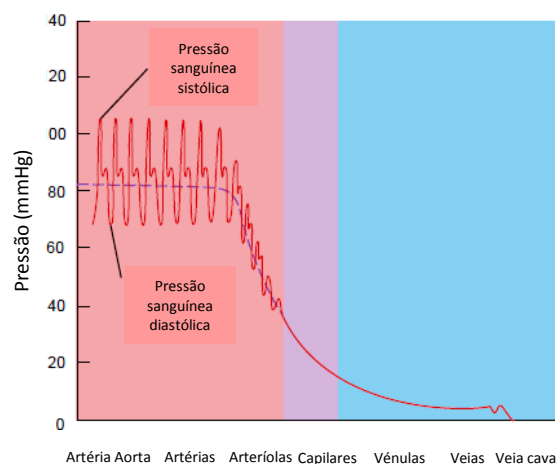


**Figura 2** - Figura ilustrativa dos vasos sanguíneos que compõem a circulação sanguínea [Adaptado de 1].

O fluxo sanguíneo corresponde ao volume de sangue que flui através de qualquer tecido num determinado período de tempo (em ml/min). O fluxo de sangue total corresponde ao débito cardíaco (DC), ou seja, o volume de sangue que circula através dos vasos sanguíneos sistêmicos por minuto. O DC vai depender de diversos fatores, tais como:

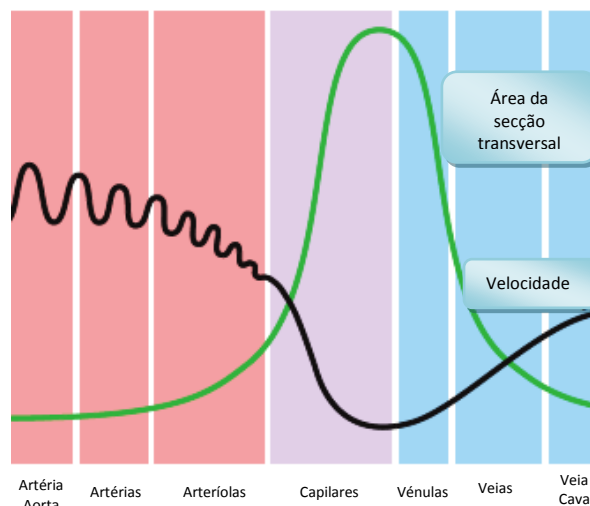
- Diferença de pressão que conduz o fluxo de sangue através de um tecido;
- Resistência oferecida pelos vasos sanguíneos ao fluxo de sangue [4].

É importante referir que o sangue flui de regiões de maior pressão para regiões de baixa pressão, sendo que quanto maior for a diferença de pressão maior será o fluxo sanguíneo presente. Por outro lado, quanto maior for a resistência oferecida à passagem do sangue, menor será o seu fluxo. A figura 3 ilustra a pressão média arterial ao longo do sistema cardiovascular [2, 5].



**Figura 3** - Figura ilustrativa da pressão média arterial ao longo do sistema cardiovascular [Adaptado de 2].

Relativamente à velocidade do fluxo sanguíneo (em cm/s) esta é inversamente proporcional à área da secção transversal, ou seja, a velocidade é mais lenta onde a área total da secção transversal é maior. A figura 4 ilustra a relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo e a área total da secção transversal nos diversos vasos sanguíneos [2, 5].



**Figura 4** - Figura ilustrativa da relação entre a velocidade do fluxo sanguíneo e a área total da secção transversal nos diversos vasos sanguíneos [Adaptado de 2].

Podemos concluir que a velocidade do fluxo sanguíneo diminui à medida que este se move da artéria aorta para as arteríolas e daí para os capilares, cuja área total da secção transversal é maior. Por outro lado, quando as vénulas se unem para formar as veias, o fluxo sanguíneo torna-se mais rápido. Os capilares são os vasos sanguíneos que apresentam, no seu conjunto, a menor taxa de fluxo sanguíneo, tal facto favorece a troca de componentes entre o sangue e os tecidos. A tabela 1 ilustra a área total da secção transversal e a velocidade média do sangue dos principais vasos sanguíneos, num adulto saudável [2, 5].

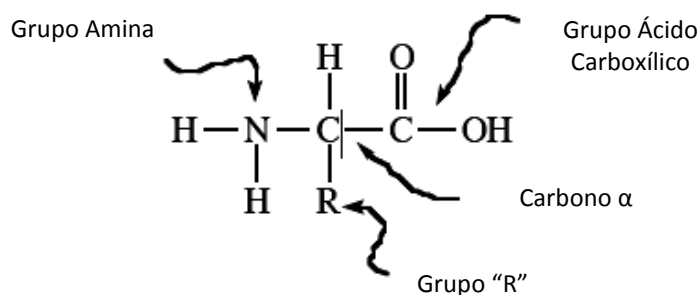
**Tabela 1** - Tabela ilustrativa da área total da secção transversal e da velocidade média do sangue dos principais vasos sanguíneos [Adaptado de 2].

<i>Vaso sanguíneo</i>	<i>Área da secção transversal</i>	<i>Velocidade média do sangue</i>
<b>Artéria Aorta</b>	3-5 cm <sup>2</sup>	40 cm/s
<b>Capilar</b>	4500-6000 cm <sup>2</sup>	< 0,1 cm/s
<b>Veia cava</b>	14 cm <sup>2</sup>	15 m/s

## 2. Proteínas

As proteínas são polímeros biológicos lineares, cuja unidade monomérica é o aminoácido (figura 5). Estes encontram-se ligados entre si por meio de ligações peptídicas, formando uma cadeia polipeptídica [6, 7]. As proteínas podem ser constituídas por uma ou mais cadeias polipeptídicas, contendo estas na sua constituição um grupo ácido (ácido carboxílico: COOH) e um grupo amina (NH<sub>2</sub>). Estes dois grupos encontram-se ligados a um átomo de carbono, designado de C $\alpha$  (carbono alfa) [8]. A região composta pelo grupo carboxílico, grupo amina e C $\alpha$  é comum a todos os aminoácidos [6].

São conhecidos, atualmente, cerca de vinte aminoácidos diferentes, sendo estes identificados pelo grupo de átomos que se encontra ligado ao C $\alpha$ , designado de grupo "R". Este grupo forma a restante estrutura do aminoácido, a qual é designada de cadeia lateral [6].



**Figura 5** - Figura ilustrativa da estrutura de um aminoácido [Adaptado de 6].

A identificação de cada uma das proteínas é efetuada não só de acordo com a sua identidade (grupo “R”), como também com o número de unidades de aminoácidos presentes e respetiva ordem sequencial [6].

A estrutura tridimensional das proteínas é resultado do conjunto de interações intramoleculares e intermoleculares. As proteínas podem apresentar quatro tipos de estrutura dependendo do tipo de aminoácidos que possuem, do tamanho da cadeia e da configuração espacial da mesma. A estrutura primária relaciona-se com a sequência de aminoácidos presentes ao longo da cadeia polipeptídica, sendo esta específica de cada proteína e, normalmente, determinada geneticamente. Esta estrutura apresenta uma extremidade amina e uma outra extremidade carboxílica. A estrutura secundária consiste no arranjo espacial dos aminoácidos constituintes da proteína por meio de pontes de hidrogénio, possibilitando, desta forma, que a proteína tenha uma estrutura em  $\alpha$ -hélice ou uma estrutura em folha- $\beta$  [9]. Esta estrutura leva, conseqüentemente, à conformação da proteína, a qual é determinada pela natureza do seu arranjo espacial. Como tal, as proteínas podem dividir-se em globulares (proteínas dobradas e enroladas) e em fibrosas (filamentosas e alongadas). Relativamente à estrutura terciária esta descreve o arranjo tridimensional do polipéptido. Por fim, a estrutura quaternária diz respeito à combinação de estruturas terciárias independentes, nas proteínas com mais do que uma cadeia polipeptídica [8].

O estudo do comportamento das proteínas torna-se extremamente importante, na medida em que quando um material entra em contacto com o sangue, a adsorção de componentes proteicos é, efetivamente, o primeiro evento que decorre da interação destes [10].

### **3. Biocompatibilidade**

A crescente necessidade de incorporar dispositivos artificiais no corpo humano despoletou o desenvolvimento de novos materiais biologicamente compatíveis [11]. Assim, é de esperar um crescente número de funções biológicas assumidas por



dispositivos artificiais, não apenas ao nível da monitorização, mas também na reparação de funções biológicas danificadas.

Deste modo, passou a ser uma das principais prioridades da indústria de dispositivos médicos resolver o problema de projetar e fabricar esses materiais tornando-os compatíveis com o tecido vivo [11].

Os materiais presentemente utilizados nesta vasta gama de aplicações biomédicas devem, ainda, obedecer a rigorosas exigências, nomeadamente, baixa rugosidade tendo, desta forma, em vista não só a diminuição do desgaste gerado pelos componentes celulares, como também uma boa resistência à corrosão eletroquímica [12].

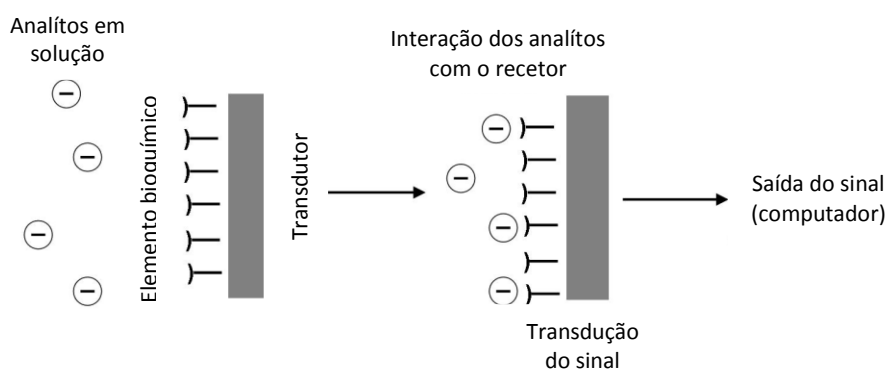
A crescente procura de biomateriais capazes de oferecer o melhor desempenho ao nível dos dispositivos biomédicos é justificada pela existência de uma vasta diversidade de formas de interação entre os materiais e os componentes constituintes do corpo humano [13].

Neste contexto, a biocompatibilidade abrange as várias interações que existem entre o biomaterial implantado e o respetivo ambiente biológico, bem como o conjunto de respostas que o tecido humano desencadeia, de forma, a aceitar ou a rejeitar o mesmo [13, 14]. Assim, esta é baseada na capacidade de um material gerar uma resposta adequada a um determinado hospedeiro, numa situação específica [15].

## **4. Biossensor**

Desde a publicação do seu trabalho acerca do elétrodo de oxigénio, em 1956, que o prof. Clark Jr. é considerado o pai do conceito “biossensor” [16]. Contudo, foi em 1967 que o conceito “biossensor” se expandiu consideravelmente, em virtude do trabalho realizado por Updike e Hicks. Estes descreveram o primeiro elétrodo enzimático funcional com base na glicose oxidase (GOX) depositada num sensor de oxigénio, tendo este trabalho experimental despoletado um grande número de pesquisas e criação de dispositivos [16].

Os biossensores têm sido amplamente utilizados como uma poderosa ferramenta analítica em diagnósticos médicos. Estes dispositivos são, geralmente, fabricados com a função de imobilizar um material biológico na sua superfície, convertendo o respetivo sinal bioquímico em sinais elétricos [12]. Assim, os biossensores podem ser definidos como dispositivos analíticos compactos que reúnem um elemento bioquímico, comumente conhecido como recetor, possuindo elevada seletividade para reconhecer o analíto alvo [17, 18]. Este reconhecimento ocorre por meio de uma ligação entre o recetor e o respetivo analíto de interesse com uma unidade de conversão de sinal. Esta unidade de sinal é conhecida como transdutor físico-químico, o qual tem como principal função a transformação da supracitada ligação num sinal físico mensurável, proporcional à concentração do analíto específico [17 - 19]. Desta forma, nos biossensores, o princípio de medição pode ser realizado com base em mudanças ao nível das propriedades dielétricas, distribuição de carga, bem como dimensão e forma [20] e cujo sinal é transmitido para uma unidade de registo [12, 17, 18]. Estes componentes encontram-se ilustrados na figura 6.



**Figura 6** - Figura ilustrativa dos componentes constituintes de um biossensor [Adaptado de 18].

O uso de materiais biológicos como elementos de reconhecimento confere aos biossensores uma notável capacidade para reagir especificamente com o analíto de interesse, distinguindo-o de compostos estruturalmente semelhantes [17, 18]. São diversas as vantagens associadas à utilização de moléculas biológicas enquanto entidade de reconhecimento num biossensor, designadamente elevada seletividade e

sensibilidade. Por exemplo, no caso da enzima GOX esta irá funcionar como um recetor seletivo, uma vez que o único açúcar com o qual esta irá interagir será a glicose [18]. Como tal, características como seletividade e sensibilidade são de extrema importância no que à aplicabilidade de biossensores para monitorização contínua diz respeito [21].

## **5. Diamante**

Durante os últimos anos, têm surgido estudos que demonstram as enormes potencialidades da utilização de filmes de diamante CVD em biossensores nas áreas da biomedicina e biotecnologia [22, 23]. Este facto tem por base as excelentes propriedades físicas, químicas e biológicas do diamante relativamente aos restantes materiais [24, 25].

### **5.1. Propriedades do diamante**

O diamante é uma das formas alotrópicas do carbono, de estrutura cúbica. Neste material, os átomos de carbono encontram-se ligados por meio de ligações covalentes  $sp^3$  numa estrutura cúbica de faces centradas (FCC) [26, 28, 29].

Tal como já foi referido, em virtude das suas excecionais propriedades físicas, químicas, mecânicas e biológicas, o diamante é considerado um biomaterial bastante promissor em diversas aplicações biomédicas e biotecnológicas [22, 23, 27, 29].

A tabela 2 ilustra, sinteticamente, as principais características do diamante.

**Tabela 2** – Tabela ilustrativa das principais propriedades do diamante [28].

<b>Propriedade</b>	<b>Valor/Unidade</b>
<b>Densidade</b>	3,51 g cm <sup>-3</sup>
<b>Dureza</b>	80-100 GPa
<b>Condutividade Térmica</b>	5-20 W cm <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
<b>Módulo de Young</b>	1050 GPa
<b>Banda Proibida</b>	5,4 eV
<b>Coefficiente de Expansão Térmica</b>	1,1x10 <sup>-6</sup> K <sup>-1</sup>
<b>Resistividade Elétrica</b>	10 <sup>12</sup> -10 <sup>16</sup> Ωcm
<b>Resistência à compressão</b>	>110 GPa
<b>Resistência à tração</b>	>1,2 GPa

Resumidamente, o diamante possui uma elevada dureza, bem como o maior módulo de Young, quando comparado com os restantes materiais conhecidos [26, 30]. O diamante apresenta um baixo coeficiente de auto-atrito, sendo, ainda, um material quimicamente inerte para temperaturas inferiores a 1900 K e na ausência de oxigénio. Apresenta uma elevada resistência à corrosão [27], elevada estabilidade mecânica e química, o que o torna num candidato ideal para aplicações biomédicas [22, 23, 29]. Tendo este material uma condutividade térmica superior à do cobre (20 W.cm<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>) e um baixo coeficiente de expansão térmica, torna-se num material bastante atrativo para aplicações a elevadas temperaturas [30, 31]. O diamante é, ainda, um material opticamente transparente desde a gama do ultravioleta (UV) até à radiação infravermelha (IV) [26].

## **5.2. Filmes de diamante CVD**

Os filmes de diamante obtidos pelo processo de deposição química em fase de vapor (CVD) são revestimentos finos, normalmente formados por um grande número de cristais de diamante (filmes policristalinos), os quais crescem a partir de uma fase gasosa,

sob a superfície de um substrato. Estes cristais podem apresentar diversas dimensões, de acordo com as condições experimentais aplicadas ao longo do processo, podendo variar desde a escala nanométrica (entre 10 nm e 100 nm) até à escala micrométrica ( $> 1 \mu\text{m}$ ) [32].

Relativamente à orientação dos cristais, esta pode ocorrer segundo a forma epitaxial ou acontecer de uma forma totalmente aleatória. Além do mais, é comum a ocorrência de imperfeições nas fronteiras de grão dos cristais, durante o processo de crescimento do filme, em virtude da formação de materiais amorfos (carbono não-diamante), do desalinhamento dos grãos adjacentes, bem como da segregação de impurezas, sendo que todos estes fatores irão contribuir para um decréscimo da qualidade cristalográfica do filme [32, 33].

## **6. Técnica de deposição química em fase de vapor - CVD**

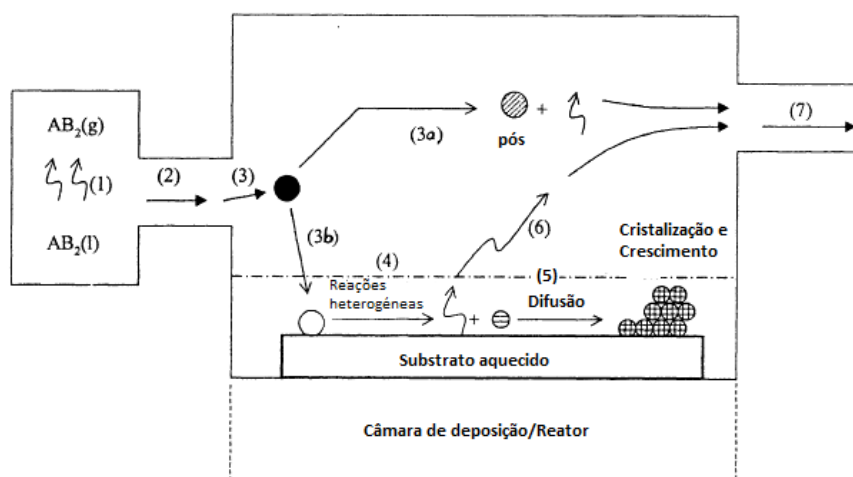
O uso do diamante, à escala industrial, teve início na década de 50 pela “*General Electric*”. Esta empresa realizou a primeira síntese de diamante, por meio da técnica HPHT (*High pressure high temperature*), a qual era capaz de reproduzir condições análogas às do crescimento do diamante natural [34]. Contudo, fatores como elevado custo, bem como produção de diamante com um tamanho de grão limitado, fizeram com que se desenvolvessem, posteriormente, processos alternativos capazes de suprir estas e outras limitações [26].

Nas últimas décadas, verificou-se um crescente interesse na deposição de diamante utilizando o processo de deposição química em fase de vapor (CVD). Este processo de deposição de diamante apresenta muitas vantagens relativamente ao método HPHT, uma vez que apresenta um menor custo, maior simplicidade de manuseamento, permitindo, ainda, uma grande área de deposição, bem como o crescimento contínuo de filmes finos metálicos, dielétricos ou semicondutores [26, 35, 36].

No processo CVD a formação de filmes de diamante sobre a superfície de um substrato é realizada por meio de um conjunto de reações químicas [26], as quais podem ser ativadas termicamente, por combustão ou por plasma [35, 38].

A deposição de filmes de diamante, pelo processo CVD, está dividida nas seguintes etapas:

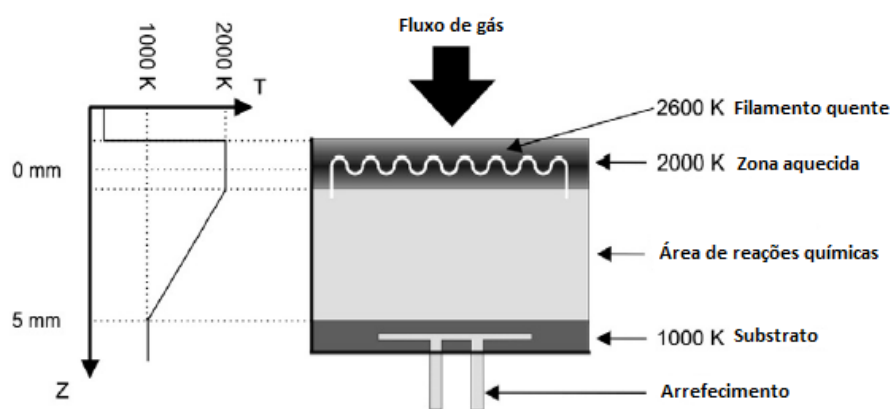
1. Formação de espécies ativas a partir dos precursores gasosos;
2. Transporte das espécies gasosas ao longo da câmara de reação, sofrendo diversas reações, as quais levam à formação de espécies intermediárias;
3. Adsorção dos reagentes gasosos, na superfície do substrato aquecido, ocorrendo reações na interface gás-sólido, as quais levam à formação de depósitos. Estes acabam por se difundir, ao longo da superfície do substrato aquecido, formando um centro de cristalização e, conseqüente, crescimento do filme. A figura 7 ilustra estas etapas:



**Figura 7** - Esquema ilustrativo das diversas etapas da técnica CVD durante a deposição do filme de diamante [adaptado de 35].

A técnica de deposição química em fase de vapor assistida por filamento quente (HFCVD – *hot filament chemical vapour deposition*) tem sido a mais amplamente explorada nos últimos anos para a deposição de filmes de diamante, apresentando, tal como já foi referido, inúmeras vantagens relativamente a outros métodos de revestimento [25, 35, 36].

No processo HFCVD são diversos os reagentes gasosos (precursores) utilizados na produção de diamante, contudo, na maioria dos casos, é usada uma mistura de metano e hidrogénio, a qual é injetada para o interior da câmara do reator [35]. A dissociação e as reações químicas de reagentes gasosos ocorrem num ambiente ativado por um filamento de metal refratário (tungsténio), aquecido a uma temperatura superior a 2000°C. A elevada temperatura do filamento constitui a força motriz para a criação de espécies reativas, utilizadas para o crescimento do respetivo filme [35]. Outros parâmetros como a temperatura da amostra, pressão do gás, concentração do reagente e fluxo de gás total requerem um controlo preciso ao longo de todo o processo de deposição. Em particular, conhecer a temperatura do substrato onde o revestimento é depositado é crucial, uma vez que é esta que controla não só a termodinâmica, como também a cinética de todo o processo de revestimento. Pequenas mudanças na temperatura do substrato podem alterar a reação e/ou a cinética, resultando, desta forma, num revestimento com as características não pretendidas. Por outro lado, a capacidade dos reagentes gasosos em alcançar a superfície do substrato e a temperatura da superfície na qual a reação ocorre são fatores, deveras, importantes que podem influenciar a uniformidade do revestimento [25, 35, 36].



**Figura 8** - Esquema ilustrativo do revestimento de substratos pela técnica HFCVD [Adaptado de 26].

O processo HFCVD é, atualmente, bastante importante na tecnologia de revestimentos para produção de filmes finos, funcionais e semicondutores, bem como na criação de superfícies com propriedades específicas [25, 35, 36].

## **6.1. Nucleação e crescimento dos filmes de diamante**

A deposição dos filmes de diamante, pelo processo CVD, está dividida em duas etapas:

- Nucleação;
- Crescimento.

### **6.1.1. Nucleação**

A etapa da nucleação dos filmes de diamante é de capital importância para a definição das características finais dos filmes de diamante. De facto, as propriedades físico-químicas, morfologia, homogeneidade e a adesão dos filmes de diamante estão intimamente relacionadas com o processo de nucleação. Contudo, o processo de nucleação do diamante não ocorre espontaneamente em superfícies que não sejam diamante [39 - 41]. Como tal, foram estudadas diversas técnicas para favorecer o processo de nucleação e aumentar a densidade da mesma [42].

Em 1990, Yugo et al [43] foi um dos primeiros investigadores a estudar este fenómeno, propondo um método eficiente para promover a nucleação, nomeadamente, tratamento dos substratos em ultrassons com um pó abrasivo, havendo, por conseguinte, a formação de “sementes” de diamante na superfície do substrato, extremamente importantes para que ocorra o processo de nucleação [40].

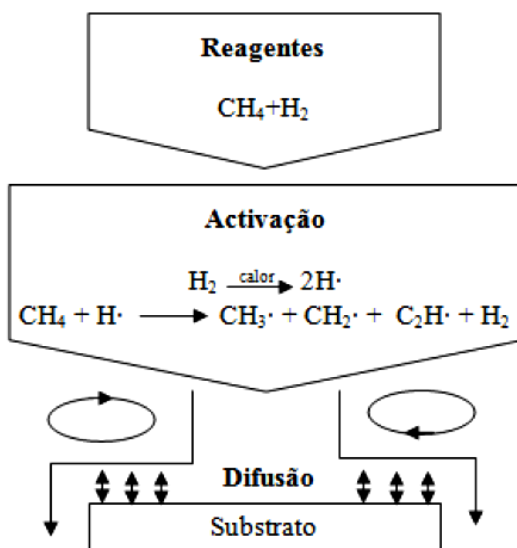
Outros métodos como banho de ultrassons em suspensão de diamante, semeadura (“*seeding*”) com nanodiamante, revestimento prévio com grafite, carbono amorfo ou fulerenos e implantação iónica são, igualmente, utilizados para promover o processo de nucleação [42, 44].

Uma elevada taxa de nucleação durante a fase inicial de crescimento dos filmes de diamante é extremamente importante de forma a obter-se rapidamente um filme contínuo, em particular, em filmes nanocristalinos (filmes policristalinos com tamanhos de cristalite  $< 1\mu\text{m}$ ) [42].



### 6.1.2. Crescimento

Após a colocação do substrato no interior do reator HFCVD, os gases (hidrogénio molecular e hidrocarbonetos) são ativados por filamento quente (a uma temperatura de, aproximadamente, 2000°C), havendo a produção das espécies precursoras que irão dar origem aos filmes de diamante [45]. O hidrogénio molecular é convertido em hidrogénio atómico, após o contacto com os filamentos quentes [46], sendo este o responsável pela remoção das ligações  $sp^2$  (grafite e carbono amorfo) presentes na superfície do substrato, permitindo, desta forma, a estabilização das ligações de diamante ( $sp^3$ ) na superfície do mesmo [42, 46]. O hidrogénio atómico reage, igualmente, com espécies ativas, presentes no reator, fator fundamental para a nucleação e crescimento de diamante na superfície do substrato. As espécies formadas atingem a superfície do substrato, por meio de um processo difusivo, dando-se, por conseguinte, a nucleação e crescimento do filme de diamante [47, 48]. A figura 9 demonstra, esquematicamente, o processo HFCVD utilizado para a síntese dos filmes de diamante:



**Figura 9** - Figura ilustrativa do processo HFCVD para os filmes de diamante [Adaptado de 48].

## 7. Substrato à base de Nitreto de Silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ )

Para além das condições de deposição dos filmes de diamante, a escolha do substrato é extremamente importante, uma vez que este irá funcionar como suporte à nucleação e crescimento dos filmes. Assim, na escolha do material para o substrato exige-se que este:

- Permita uma boa adesão do filme de diamante. Para tal, é necessário que o substrato tenha um coeficiente de expansão térmica semelhante ao do diamante ( $0,8 \times 10^{-6} < \alpha_T < 4,5 \times 10^{-6}$  a  $20^\circ\text{C} < T < 1500^\circ\text{C}$ );
- Consiga suportar as elevadas temperaturas de deposição;
- Tenha a habilidade de não dissolver o carbono ou originar a formação de grafite;
- Seja um dielétrico, semicondutor ou metal, dependendo da aplicação final pretendida [49 - 51].

Para este trabalho foram escolhidos os substratos cerâmicos de nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) obtidos pelo processo de sinterização sem pressão. Estes materiais são, atualmente, considerados uns dos mais apropriados, enquanto suporte à deposição de filmes de diamante, uma vez que apresentam uma elevada afinidade para o crescimento destes filmes, pois apresentam, entre outras propriedades, um coeficiente de expansão térmica bastante próximo ao do diamante ( $2,9 \times 10^{-6} < \alpha_T < 3,6 \times 10^{-6}$  a  $20^\circ\text{C} < T < 1500^\circ\text{C}$ ) [46, 52]. Estes substratos cerâmicos são, ainda, bastante conhecidos pela elevada tenacidade à fratura, elevada dureza, bem como baixa densidade e reconhecidas propriedades bio-inertes [53, 54]. Estas propriedades são imprescindíveis para uma excelente resistência ao desgaste, o que, combinado com a inércia química do  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , transforma este material num candidato apropriado para aplicações bio-tribológicas [22]. Além disso, como estes substratos são excelentes isoladores elétricos, podem ser utilizados como suporte de filmes condutores, como os que foram desenvolvidos neste trabalho. As principais propriedades do  $\text{Si}_3\text{N}_4$  encontram-se descritas na tabela 3.

**Tabela 3** - Tabela ilustrativa das principais propriedades do nitreto de silício [adaptado de 55].

<i>Propriedades</i>	<i>Valor</i>
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	3,2 – 3,3
Resistência à flexão (MPa)	800 – 1000
Tenacidade à fratura (MPa/m <sup>1/2</sup> )	6 – 8
Dureza (GPa)	15 – 16
Módulo elástico (GPa)	280 – 320

## 8. Biossensores de diamante CVD

A aplicação de filmes de diamante CVD em biossensores nas áreas da biomedicina e biotecnologia tornou-se uma mais-valia, em virtude das suas importantes propriedades físicas, químicas e biológicas [22-24]. A incorporação de dopantes na sua estrutura cristalina pode originar um semicondutor do *tipo-p* ou do *tipo-n* [24]. De entre todos os elementos químicos, o boro é o elemento mais eficaz na criação de diamante semicondutor do *tipo-p*, podendo mesmo atingir-se condutividade do tipo metálica para doses mais elevadas de dopante [56]. Os filmes de diamante dopados com boro (BDD) apresentam também uma elevada estabilidade eletroquímica, boa condutividade térmica e excelente biocompatibilidade, sendo, atualmente, amplamente utilizados numa grande variedade de aplicações sensoriais eletroquímicas e biológicas [57 - 59].

## 9. Enquadramento do tema

De acordo com o acima descrito, a aplicação de diamante CVD dopado com boro a biossensores, revela um enorme potencial.

Em particular, a sua utilização em biossensores implantáveis requer que a superfície seja bio-inerte, dado que o contacto prolongado com compostos biológicos pode levar à

formação de apatites na superfície, comprometendo, desta forma, a função do biossensor. Ao mesmo tempo, é também importante ter em atenção a adesão de proteínas à superfície do filme de diamante, fenómeno este que ocorre quase sempre quando um material entra em contacto com um meio fisiológico.

Estudos recentes mostram que os filmes de diamante ultra-nanocristalino (UNCD), não dopados com boro são bio-inertes, não se observando qualquer formação de hidroxiapatite após o contacto com uma solução de SBF, durante 10 dias [22, 60]. Um destes estudos mostra, ainda, que a adesão da proteína albumina nas referidas superfícies de diamante é reduzida estando diretamente dependente da terminação superficial [22]. Contudo, nenhum trabalho foi, até ao momento, realizado em filmes de diamante dopados com boro depositados em substratos isoladores de nitreto de silício. Além do mais, se pretendermos utilizar tais materiais em dispositivos implantáveis, é necessário conhecer os efeitos da interação destas superfícies com o meio fisiológico para tempos de contacto mais longos.

Como tal, este trabalho laboratorial recaiu, maioritariamente, sobre essa questão, procurando contribuir de forma positiva para esta área, fortemente promissora.



## **Capítulo II**

---

### **Procedimento e técnicas experimentais**

## **1. Produção dos substratos de Nitreto de Silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ )**

Os substratos cerâmicos de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  foram produzidos recorrendo à técnica de sinterização sem pressão (PSSN), tendo-se utilizado a seguinte composição de pós:

- 89,3% em peso de  $\alpha$ -  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (Starck Grau M11);
- 7% em peso de  $\text{Y}_2\text{O}_3$  (Starck grau C);
- 3,7% em peso de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (ALCOA CT-3000SG).

Estes pós foram misturados e processados por via húmida (isopropanol), ao longo de 8 horas e a 180 RPM, em cubas de ágata, num moinho planetário, de marca Retsch PM 400. A suspensão obtida foi desaglomerada e submetida, seguidamente, a um processo de secagem em estufa (60°C), durante 8 horas. Por meio da prensagem isostática, o pó, previamente seco, foi prensado a 300 MPa, tendo-se obtido um provete de nitreto de silício com 10 mm de diâmetro e 100 mm de comprimento. Para a realização do processo de sinterização, o provete foi colocado num forno de grafite (Thermal Technologies Inc.) a uma temperatura de 1750°C, durante 120 minutos, numa atmosfera de azoto, tendo-se seguido o arrefecimento a uma taxa de 10°C/minuto. Recorreu-se então a uma máquina de corte (Struers Secotom-10) para o corte do material cerâmico na forma de pequenos discos de 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Por fim, as amostras foram submetidas a um processo de retificação, sendo, posteriormente, polidas com diversas suspensões de diamante.

## **2. Deposição de Diamante**

### **2.1. Preparação dos substratos de Nitreto de Silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ )**

Nos substratos de  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , o crescimento de filmes de diamante só ocorre se existirem “sementes” para a nucleação do diamante na sua superfície.

Apesar do próprio processo de produção dos substratos já incluir etapas onde o diamante está inevitavelmente presente (mó diamantada, disco de corte, polimento mecânico com diversas suspensões de diamante), este procedimento termina com um acabamento à base de sílica coloidal, o qual acaba por remover grande parte destes potenciais núcleos de crescimento.

Assim, como forma de garantir uma elevada densidade superficial destes núcleos, é habitual realizar antes do processo de deposição, uma riscagem da superfície da amostra com pó de diamante. Para este trabalho em particular, foi utilizado o seguinte procedimento:

1. Polimento mecânico manual, durante 10 minutos, num pano de polimento *Struers MD-Nap*, de diâmetro 200 mm, com pó de diamante de granulometria 0,5 – 1  $\mu\text{m}$ ;
2. Riscagem ultrassónica, durante 30 minutos, com a amostra numa suspensão de pó de diamante de granulometria 15  $\mu\text{m}$  em etanol;
3. Limpeza das amostras através de agitação ultrassónica em etanol, durante 5 minutos, procedimento realizado 3 vezes.

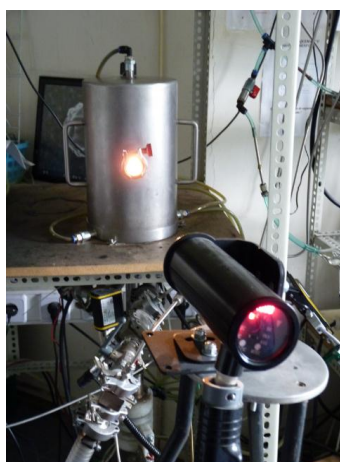
## **2.2. Reator HFCVD**

Para a deposição de diamante nos vários substratos de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  recorreu-se ao uso de um reator HFCVD com 5L de volume, construído no laboratório, e com uma área máxima de deposição de 6x5  $\text{cm}^2$ . Através deste reator é possível obter-se filmes de diamante dopados, por meio da introdução de boro. Como filamento quente foram utilizados 6 filamentos de tungsténio, com 0,25mm de diâmetro e pureza de 99,95%, bem como uma fonte de alimentação de 3kW (*Delta Elektronika*) para o aquecimento dos mesmos. Para o fornecimento dos precursores gasosos e medição da pressão total dos gases na câmara recorreu-se a controladores de fluxo (*Mass Flow Controllers, MFC, Bronkhorst e Aalborg*) e a um sensor piezoelétrico, respetivamente. Relativamente à temperatura do substrato, esta foi medida através de um termopar do tipo K, colocado em contacto com a superfície



inferior da amostra. A medição da temperatura dos filamentos foi realizada com um pirômetro de duas cores, de marca *Raytek Marathon Series*. O circuito de vácuo contém um circuito de desvio (*by-pass*) provido com uma válvula de agulha, a qual possibilita um ajuste rigoroso da pressão no interior do reator. O controlo e registo do fluxo de gases, bem como a monitorização da temperatura e pressão são possíveis, visto que todo o sistema se encontra ligado a um computador por meio de uma placa de aquisição de dados DAQ.

A figura 10 ilustra o reator HFCVD, presente no laboratório, no qual foram produzidos filmes de diamante dopados com boro nos substratos de  $\text{Si}_3\text{N}_4$ :



**Figura 10** - Figura ilustrativa do reator de HFCVD utilizado para a deposição de filmes de BDD nos substratos de  $\text{Si}_3\text{N}_4$ .

Para a obtenção de filmes de diamante dopados com boro foi utilizado um borbulhador (figura 11), no qual foi colocada uma solução de  $\text{B}_2\text{O}_3$  em etanol, com uma concentração em volume de B/C de 5000 ppm. O transporte desta solução para a câmara foi realizada fazendo-se passar, pelo borbulhador, gás árgon (Ar). Assim, através da variação do fluxo de Ar é possível controlar a quantidade de boro introduzida na câmara, durante cada deposição.



**Figura 11** - Figura ilustrativa do borbulhador utilizado na deposição de filmes de diamante dopados com boro pela técnica HFCVD.

### **2.3. Deposição dos filmes de diamante CVD**

O início da deposição dos filmes de diamante começa com a carburização dos filamentos de tungsténio (figura 12). Esta etapa é crucial como forma de prolongar a durabilidade dos filamentos e reduzir, ao máximo, a contaminação das amostras por tungsténio metálico. Assim, nos primeiros 10-15 minutos de deposição, é utilizada uma atmosfera bastante mais rica em carbono ( $\text{CH}_4/\text{H}_2 = 0,05$ ), a uma pressão constante de 50 mbar. Terminada a carburização, dá-se início à deposição de diamante dopado com boro, segundo as condições pretendidas.



**Figura 12** - Figura ilustrativa dos filamentos de tungsténio utilizados para a deposição dos filmes de diamante dopados com boro pela técnica HFCVD.

De forma a obter filmes de diamante com diferentes microestruturas, recorreu-se à variação de diversos parâmetros de deposição, nomeadamente, pressão (P) e razão de fluxos metano/hidrogénio ( $\text{CH}_4/\text{H}_2$ ), como é ilustrado na tabela 4. Parâmetros como fluxo de hidrogénio, fluxo de árgon, tempo de deposição, bem como ausência de rotação do substrato foram mantidos constantes, ao longo das diversas deposições.

**Tabela 4** - Tabela ilustrativa da variação dos parâmetros de deposição.

<b>Condições de deposição</b>	<b>Amostras</b>					
	<b>A'/A</b>	<b>B'/B</b>	<b>C'/C</b>	<b>D'/D</b>	<b>E'/E</b>	<b>F'/F</b>
<b><math>\text{CH}_4/\text{H}_2</math></b>	0,016	0,032	0,016	0,032	0,048	0,064
<b>P</b>	25	25	150	150	25	25
<b>Fluxo de <math>\text{H}_2</math> (ml/min)</b>	96	96	96	96	96	96
<b>Fluxo de Árgon (ml/min)</b>	6	6	6	6	6	6
<b>Tempo de deposição (h)</b>	2	2	2	2	2	2

Para uma deposição rigorosa e de forma a obter-se filmes de diamante com uma morfologia e comportamento pretendidos é, ainda, necessário controlar e monitorizar outros parâmetros, designadamente, temperatura dos filamentos de tungsténio (entre 2200-2300°C) e do substrato, bem como a distância dos filamentos ao substrato (7mm).

No final de cada deposição, de forma a remover todas as fases gráficas e carbono amorfo presentes na superfície do filme de diamante, os fluxos de árgon e metano são desligados, efetuando-se um arrefecimento lento de cada uma das amostras, apenas na presença de hidrogénio.

### **3. Interação das amostras com uma solução fisiológica – testes *in vitro***

Quando um material é implantado no corpo humano e entra em contacto com o sangue podem ocorrer diversas interações. De forma a avaliar e a prever essas interações recorreu-se ao estudo das mesmas, através da realização de testes *in vitro*, onde as amostras permaneceram em contacto com um fluido que simula o plasma sanguíneo (SBF – *simulated body fluid*). Nestes testes as amostras foram imersas durante diversos períodos de tempo, tendo-se, posteriormente, avaliado as respetivas alterações morfológicas, estruturais, químicas e elétricas.

#### **3.1. Preparação da solução fisiológica**

A solução fisiológica SBF (*simulated body fluid*) foi preparada utilizando o método desenvolvido por Kokubo [61].

Na tabela 5 apresentam-se os reagentes, os respetivos graus de pureza, bem como as quantidades utilizadas na preparação de 1000 ml de solução.

**Tabela 5** - Tabela ilustrativa dos vários reagentes utilizados, pureza e quantidades empregadas na preparação de 1000 ml da solução fisiológica SBF. \* HEPES - ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil) etanosulfônico; \*\*O reagente HEPES foi, previamente, dissolvido em 100 ml de água desionizada [Adaptado de 61].

<i>Reagente</i>	<i>Pureza (%)</i>	<i>Quantidade para 1000 ml (g)</i>
<b>NaCl</b>	>99,5	5,403
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	>99,5	0,740
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	>99,5	2,046
<b>KCl</b>	>99,5	0,225
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . 3H<sub>2</sub>O</b>	>99,0	0,230
<b>MgCl<sub>2</sub> . 6H<sub>2</sub>O</b>	>98,0	0,311
<b>HEPES*</b>	>99,9	11,928**
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	>95,0	0,293
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	>99,0	0,072
<b>NaOH (1M)</b>	-----	≈ 0,8 ml

Os aparelhos utilizados para a preparação da solução fisiológica foram lavados com HCl em detergente neutro e água desionizada. Foram vertidos, seguidamente, 700 ml de água desionizada para um copo de polipropileno de 1000 ml, sendo esta agitada através de uma barra magnética, até se atingir 36,5°C. Os reagentes descritos na tabela 5 foram, posteriormente, dissolvidos na água, pela ordem apresentada. O pH final da solução foi ajustado para 7,40 a 36,5°C, por titulação aquosa com 1,0 M de NaOH. A solução foi, por fim, transferida para um frasco de vidro de 1000 ml, arrefecido até cerca de 20°C, sendo o seu volume total ajustado até 1000 ml, por meio da adição de água desionizada.

A solução final de SBF, assim preparada, apresenta uma composição química bastante semelhante à encontrada no plasma sanguíneo, tal como podemos observar na tabela 6:

**Tabela 6** – Comparação entre a composição química do plasma sanguíneo e a composição química do fluido fisiológico SBF [Adaptada de 61].

Iões presentes	Concentração iônica (mM)							
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
<b>SBF/Plasma Sanguíneo</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

Visto que esta solução carece da presença de componentes proteicos, foi adicionada, a esta solução fisiológica, a proteína albumina na forma de BSA (*bovine serum albumin*).

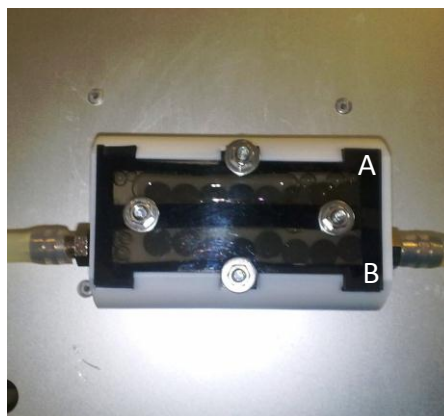
### 3.2. Estudos de Imersão

Após a preparação da solução fisiológica, as amostras foram colocadas num suporte em teflon, construído para o efeito, tal como mostra a figura 13.



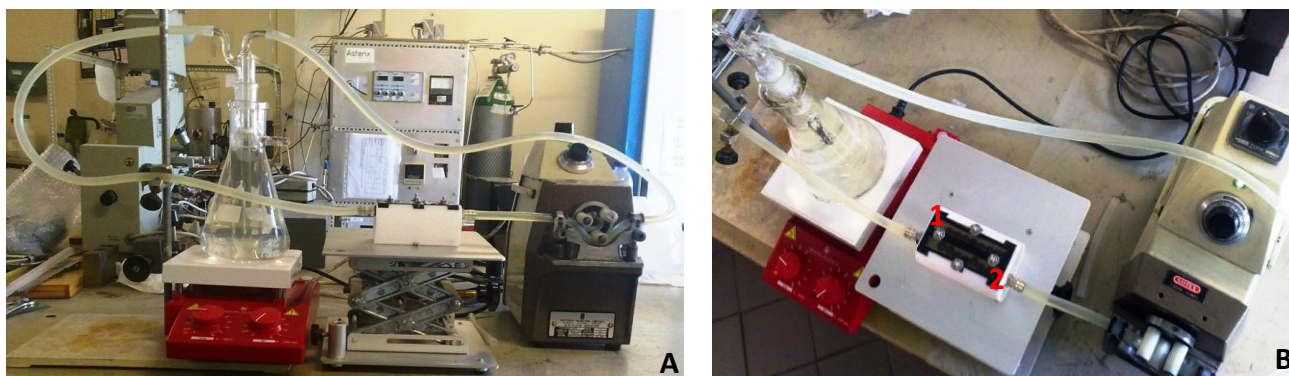
**Figura 13** - Figura ilustrativa do suporte em teflon.

Com o objetivo de estudar qual o efeito da circulação sanguínea por meio da interação da solução fisiológica com as amostras, foram criados dois compartimentos herméticos no suporte em teflon. Um compartimento para o estudo em regime estático (compartimento A da figura 14) e outro para o estudo em regime dinâmico, com um fluxo de solução de 300ml/min (compartimento B da figura 14).



**Figura 14** - Figura ilustrativa do suporte em teflon e os respectivos compartimentos herméticos com as amostras imersas na solução SBF+BSA. A – compartimento referente às amostras no fluido em regime estático; B - compartimento referente às amostras no fluido em regime dinâmico.

Enquanto que no compartimento A se colocaram 10ml de solução, no compartimento B, a solução encontrava-se num circuito fechado, no qual a circulação forçada era criada por uma bomba peristáltica e mantida a uma temperatura constante de 37°C, por meio de uma placa de aquecimento. A figura 15 ilustra o sistema montado para a colocação das diversas amostras na solução SBF+BSA em regime estático e em regime dinâmico.



**Figura 15** - Figura ilustrativa do sistema preparado para a colocação das diversas amostras na solução SBF+BSA em regime estático (1) e em regime dinâmico (2). A – Vista de frente; B – Vista de topo.

Após ensaios em períodos de 10, 20 e 30 dias, as amostras foram retiradas da solução fisiológica e limpas com uma solução tampão e água destilada, sendo realizada, posteriormente, a análise da superfície de ambos os conjuntos de amostras (A' a F' e A a F).

## **4. Técnicas de caracterização utilizadas**

### **4.1. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)/ Espectrometria de energia dispersiva (EDS)**

A microscopia eletrónica de varrimento (*Scanning Electron Microscopy* – SEM) é uma técnica de imagem, a qual estuda, principalmente, a topografia e a morfologia da superfície de materiais sólidos, até uma escala de 10 nm. Esta técnica tem como princípio o varrimento da superfície da amostra através de um feixe de eletrões. Os eletrões secundários emitidos pela superfície da amostra são recolhidos, posteriormente, por um cintilador, a partir do qual o sinal é utilizado para formar uma imagem no ecrã de visualização. Contudo, apenas superfícies que conduzem carga elétrica podem ser estudadas em grande detalhe, caso contrário irão dar origem a imagens desfocadas devido à presença de vários efeitos de carga na superfície das amostras. Como tal, materiais não condutores devem ser, previamente, pulverizados com uma fina camada de material condutor (Au ou C) e colocados, de seguida, num porta-amostras com a ajuda de fita de carbono. Neste trabalho experimental não foi realizada a pulverização com filme de carbono, uma vez que o diamante dopado com boro é, por si só, um condutor elétrico e ao pulverizar a superfície poderíamos correr o risco de alterar a sua morfologia, influenciando o resultado final. Esta técnica apresenta uma grande capacidade de ampliação, uma elevada resolução, uma profundidade de campo 500x superior à Microscopia Ótica e, ainda, a possibilidade de se observar imagens em 3D [62]. Para este trabalho laboratorial, foram utilizados dois equipamentos da marca Hitachi: o S4100 e o SU-70.

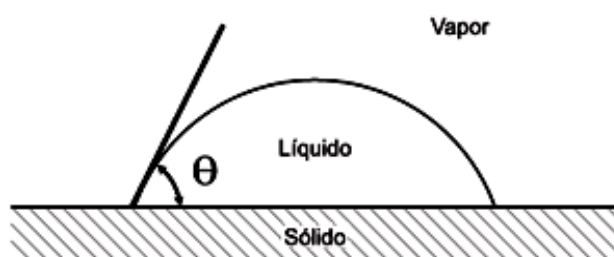
A análise realizada por SEM pode ser complementada pela técnica de medição: espectrometria de energia dispersiva (EDS). Assim, por meio do acoplamento de detetores adequados, esta técnica permite obter informação relativa à composição elementar presente nas amostras em estudo. O princípio de funcionamento desta técnica baseia-se na emissão de um espectro de raios-X pela amostra sólida, a qual é bombardeada,



previamente, por um feixe de elétrons focado, de forma a obter-se uma análise química localizada [78]. O equipamento utilizado neste trabalho laboratorial foi o *Bruker QUANTAX 400*.

## 4.2. Molhabilidade

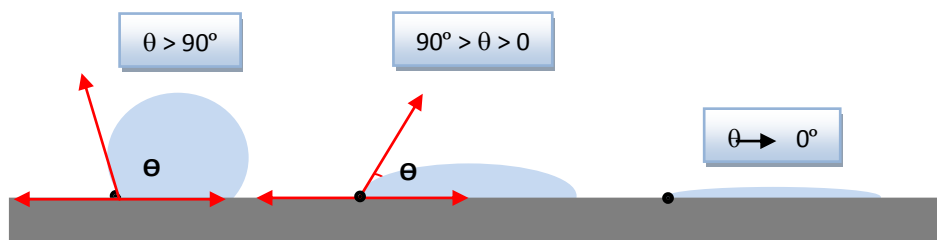
De forma a estudar as propriedades químicas da superfície das amostras em estudo foram realizadas diversas medições do ângulo de molhabilidade entre uma gota do líquido (nesta caso, água destilada) e a superfície da amostra, na qual ela repousa. Assim, o ângulo de contacto é definido como o ângulo entre um plano tangente à gota do líquido e um plano que contém a superfície onde o líquido se encontra depositado (figura 16).



**Figura 16** - Figura ilustrativa da medição do ângulo de contacto ( $\theta$ ).

Assim, para ângulos de contacto ( $\theta$ ) superiores a  $90^\circ$  as amostras são consideradas hidrofóbicas. Por outro lado, para valores de  $\theta$  inferiores a  $90^\circ$  as amostras são denominadas de hidrofílicas. Quando o valor de  $\theta$  é igual a zero, diz-se que a superfície apresenta uma molhabilidade completa (figura 17).

Neste trabalho experimental foram realizados testes de molhabilidade, com recurso ao equipamento Dataphysics e usando o método da gota séssil com água destilada, à temperatura ambiente. As gotas foram produzidas por uma seringa micrométrica e depositadas sobre a superfície em estudo. O volume de gota utilizado foi de  $2\ \mu\text{L}$ , sendo que o ângulo de contacto foi medido 30'' após o contacto da micro gota de água com a respetiva superfície.



**Figura 17** - Figura ilustrativa dos valores do ângulo de contacto  $\theta$ .

### 4.3. Espetroscopia Raman

O princípio da técnica de Espetroscopia Raman baseia-se na interação da luz do laser com determinados modos de vibração da amostra. Quando um feixe de fótons incide na superfície da amostra, pode originar dois fenómenos:

- Efeito Rayleigh – fótons dispersos e incidentes apresentam igual energia;
- Efeito Raman – fótons dispersos apresentam maior ou menor energia que os fótons incidentes [62].

A Espetroscopia Raman tem a capacidade de identificar as frequências de vibração características de vários grupos funcionais, por meio da deteção das referidas diferenças de energia, originando um espectro de estados vibracionais [62].

Esta técnica tornou-se extremamente importante na deteção e distinção das diferentes formas de carbono presentes em filmes de diamante [63-66]. O pico característico da rede cristalina do diamante surge, aproximadamente, aos  $1332\text{ cm}^{-1}$  [67]. Simultaneamente, com a linha do pico do diamante, podem surgir outras bandas, designadamente, a de grafite ou do carbono amorfo [68]. A grafite apresenta duas bandas características, nomeadamente, a banda D (grafite microcristalina desordenada) com um pico característico aos  $1350\text{ cm}^{-1}$  e outra aos  $1580\text{ cm}^{-1}$  correspondente à banda G (grafite cristalina) [67, 69].

Devemos ter, igualmente, atenção à dispersão não só da grafite (50 vezes superior em relação à do diamante), como também à do carbono amorfo (233 vezes superior),

uma vez que estas situações podem complicar a interpretação dos espectros de cada um dos filmes de diamante [70].

Apesar da Espectroscopia Raman ser uma técnica essencialmente qualitativa, através do valor da “figura de mérito” (FOM) (Equação 1) podemos obter uma análise quantitativa da qualidade dos filmes de diamante depositados [70]:

$$FOM = \frac{I_D}{I_D + I_C} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

$I_D$  – intensidades integradas da banda do diamante aos  $1332 \text{ cm}^{-1}$ ;

$I_C$  – intensidades de todas as componentes não-diamante presentes no espectro de Raman.

Neste trabalho experimental foi usado um sistema micro-Raman em modo de retrodispersão, de marca Jobin Yvon (Horiba, Japan) e modelo HR 800, com um laser de 325 nm de comprimento de onda, de marca Kimmon, IK5751I – G e uma objetiva OFR, LNU – 40x – NUV, de  $12 \text{ cm}^{-1}$  de resolução. Relativamente às condições de aquisição, foi realizado um varrimento dos 400 nm aos 1800 nm, com uma íris aos 300  $\mu\text{m}$  e uma rede de difração de 2400 linhas/mm. Quanto ao tempo de exposição, este foi de 2x15 segundos.

#### **4.4. Difração de Raios-X (DRX)**

A difração de Raios-X é um dos métodos mais importantes para a caracterização cristalina dos materiais. Esta técnica consiste na dispersão de raios-x, quando estes atravessam as camadas de átomos do material em estudo. Esta radiação dispersa pode apresentar interferência construtiva e destrutiva [62] de acordo com a Lei de Bragg (Equação 2):

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

(Equação 2)

onde “n” corresponde à ordem de difração, “λ” ao comprimento de onda da radiação, “d” à separação entre os planos e “θ” ao ângulo entre os planos e a radiação incidente. Os principais planos cristalográficos do diamante encontram-se descritos na tabela 7:

**Tabela 7** - Principais planos DRX do diamante [31]:

<i>Plano cristalográfico</i>	<i>2θ</i>	<i>Intensidade</i>
(111)	43,91	100
(220)	75,27	25
(311)	91,46	16
(400)	119,49	8
(331)	140,55	16

Para este trabalho laboratorial foi utilizado um difractómetro de marca Philips X’Pert MPD, equipado com uma fonte de radiação CuKα, com  $\lambda = 1,5406\text{\AA}$  (40kV; 50mA).

#### 4.5. Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier – FTIR

A espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que, aplicada à superfície, nos fornece informação relativa acerca das vibrações moleculares existentes no material em estudo [62]. Sabe-se que cada molécula possui uma frequência específica de vibração interna. Estas frequências surgem na região de IV do espectro eletromagnético. Portanto, quando a amostra é submetida à radiação IV, esta irá absorver a radiação em frequências correspondentes às frequências de vibração molecular, sendo o efeito medido por um espectrómetro de IV. Como resultado final iremos ter um espectro de IV, correspondente à energia absorvida vs frequência [62].

Neste estudo foi usado um equipamento PerkinElmer spectrum BX com um ATR golden gate da Specac. Relativamente aos parâmetros de aquisição, neste trabalho experimental, foi utilizada uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , com uma velocidade de aquisição de 32 scans/minuto.

#### **4.6. Microscopia de força atômica (AFM)**

A técnica de microscopia de força atômica (AFM) permite a obtenção de imagens da topografia de superfícies condutoras e isolantes. A superfície da amostra é analisada com o auxílio de uma ponta, a qual se encontra acoplada a uma mola denominada de ponteira. Assim, é obtida uma imagem topográfica da amostra em estudo através da representação gráfica das forças existentes entre a ponta e a superfície da amostra. Estas forças dependem não só da distância ponta-amostra, mas também das propriedades do material que constitui a ponta e a respetiva amostra [78].

Neste trabalho experimental foram realizadas diversas análises AFM às amostras de forma a estudarmos a rugosidade destas. Para tal, foi utilizado o equipamento Nanoscope IIIa.

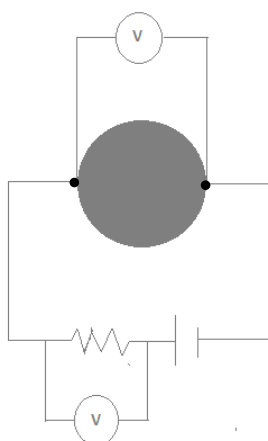
#### **4.7. Medidas elétricas**

As medidas elétricas utilizadas neste estudo foram limitadas à medição da resistência elétrica das superfícies de diamante dopadas com boro.

O material ao ser submetido a uma diferença de potencial (V) é gerada uma corrente elétrica (I), a qual depende da resistência elétrica do material (R). Assim, este estudo teve por base a Lei de *Ohm*:

$$I = \frac{V}{R} \Leftrightarrow R = \frac{V}{I} \quad (\text{Equação 3})$$

Foram estabelecidos dois contactos nas amostras em estudo com cola de prata, na qual foram aplicados fios elétricos e uma resistência em série de 470k $\Omega$  para as amostras mais condutoras e de 10M $\Omega$  para as amostras mais resistivas. As medições foram realizadas ao ar, à temperatura ambiente, tendo sido aplicada uma tensão com intervalos de 0,1V, entre valores de -10 e 10V, com 1s de intervalo e 2s de tempo de aquisição. A figura 18 ilustra o respetivo contacto elétrico com as amostras, bem como o esquema representativo da montagem do circuito.



**Figura 18** - Esquema do circuito montado para a medição elétrica das amostras.

Para a realização destas medidas elétricas foi utilizado um equipamento desenvolvido pelo grupo, o qual se encontra ligado a uma placa de aquisição de dados *National Instruments Ni DAQpad – 6015* com 16 bit de resolução e a um computador equipado com um software também desenvolvido pelo grupo, baseado na plataforma *DasyLab*.



## **Capítulo III**

---

### **Resultados e Discussão**



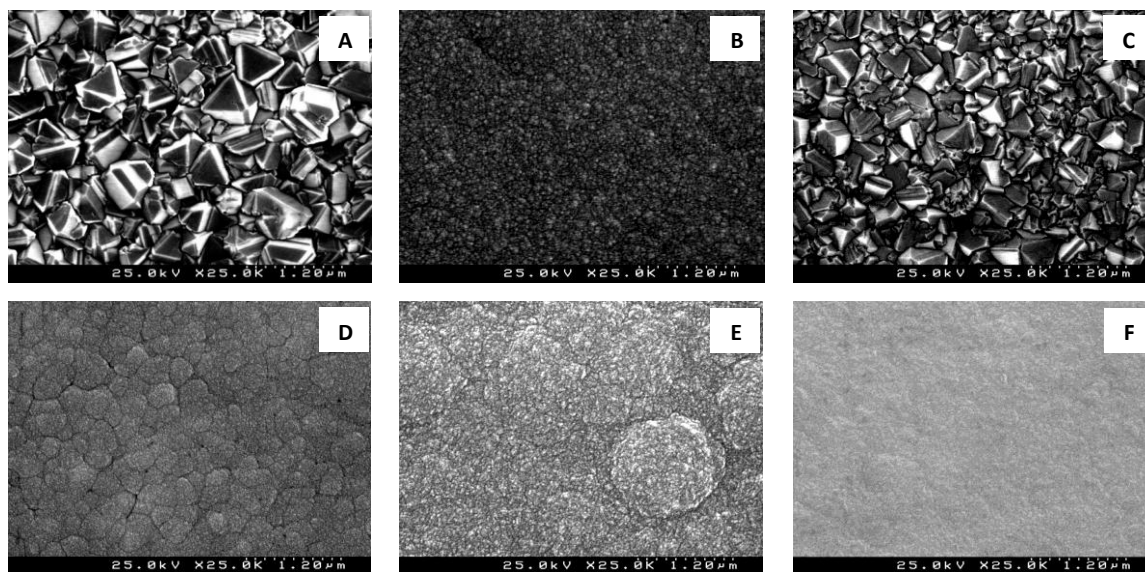
Neste capítulo serão apresentados os resultados do trabalho experimental realizado, bem como uma breve discussão dos mesmos. Esta apresentação está dividida em duas partes: na primeira serão caracterizadas as amostras obtidas imediatamente após a deposição pela técnica HFCVD, enquanto que na segunda é feita a análise das amostras durante os diversos intervalos de tempo no qual estas estiveram em contacto com o meio fisiológico. Os resultados aqui apresentados incluem a caracterização morfológica e microestrutural das amostras por meio das técnicas de SEM, EDS, Raman e DRX. Foram ainda realizados estudos de molhabilidade e de natureza química e elétrica das respetivas superfícies por meio das técnicas do ângulo de contacto, FTIR e resistividade elétrica, respetivamente.

## **1. Caracterização inicial das amostras**

### **1.1. Caracterização morfológica e microestrutural**

#### **1.1.1. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)**

Após a realização das diversas deposições, a superfície dos filmes de diamante foi caracterizada microestruturalmente através da técnica de SEM. Na figura 19 encontram-se ilustradas as imagens de SEM típicas das superfícies de crescimento do conjunto de amostras A a F, crescidas nas condições referidas na tabela 4.

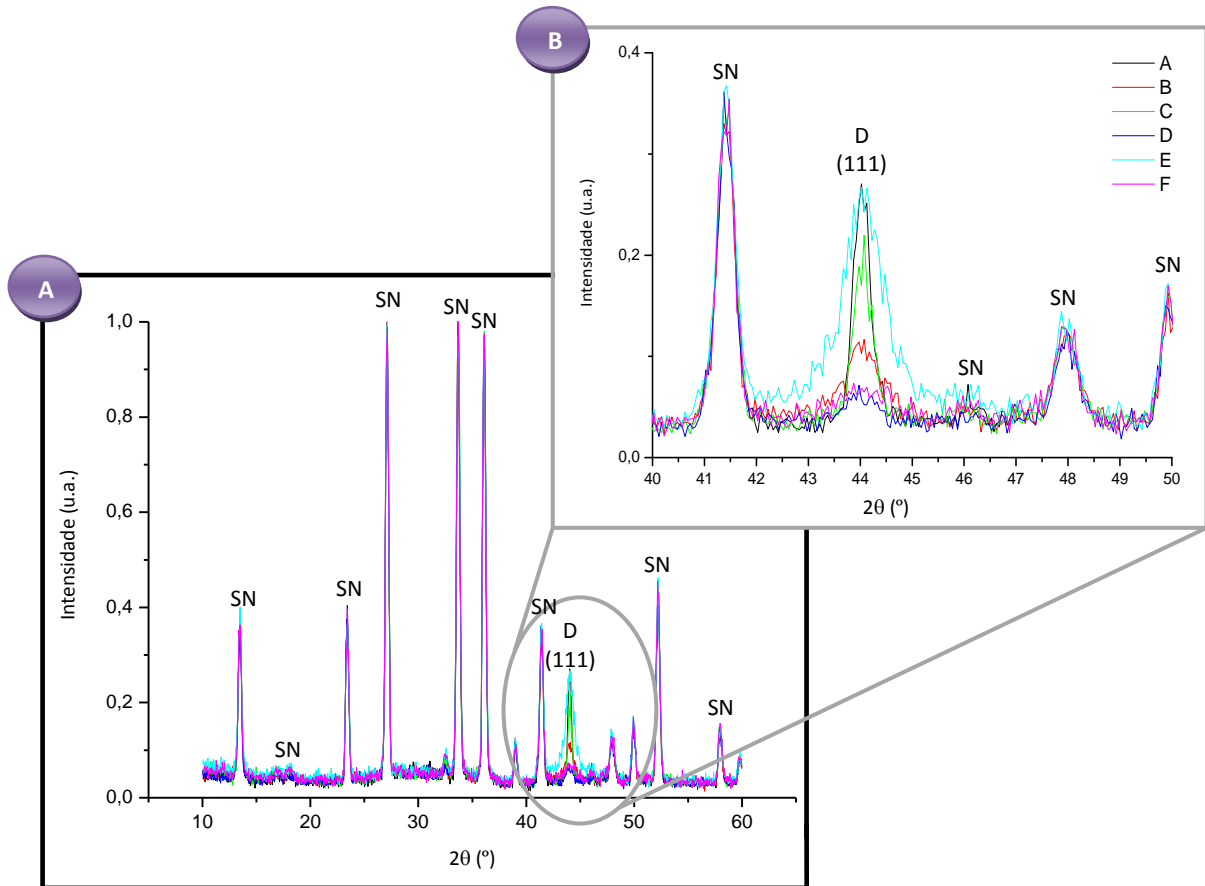


**Figura 19** – Micrografias de SEM da superfície de crescimento das amostras A a F.

Através da análise das imagens da figura 19 podemos verificar que as amostras A e C apresentam uma microestrutura composta por grãos bem definidos e facetados, ou seja, tipicamente microcristalina (MCD). Por outro lado, as amostras B, D, E e F exibem uma microestrutura caracteristicamente nanocristalina (NCD). Esta microestrutura NCD é justificada pelas condições de deposição utilizadas (tabela 4), uma vez que o aumento da pressão, bem como o aumento da razão  $\text{CH}_4/\text{H}_2$  favorecem o processo de re-nucleação originando a diminuição do tamanho da cristalite [79, 80]. Por fim, é possível verificar que a amostra E apresenta uma morfologia irregular, podendo mesmo observar-se alguns agregados na superfície desta.

### 1.1.2. Difração de Raios-X (DRX)

A figura 20 ilustra os difractogramas típicos do conjunto de amostras A a F.



**Figura 20** – A) Difractogramas das amostras A a F. SN – Nitreto de silício; D – Diamante. B) Difractogramas referente ao plano (111) do diamante das amostras A a F.

Através do difractograma da figura 20-A é possível constatar que os picos dominantes das amostras descritas na tabela 4 têm origem no substrato de  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Contudo, é possível verificar a presença de um outro pico intenso (a  $43,91^\circ$ ), o qual se encontra associado ao plano (111) do diamante (figura 20-B), estando presente em todas as amostras. Desta forma, comprova-se a formação de diamante em todas as deposições efetuadas. Além disso, a presença dominante do plano (111) em todas as amostras está de acordo com o que se encontra descrito na literatura sobre as condições ideais de crescimento para este tipo de filmes [31].

Através da análise do difractograma da figura 20-B é possível constatar que, com exceção da amostra E, quando o fluxo de  $\text{CH}_4$  aumenta, a cristalinidade dos filmes de diamante diminui, em virtude do aumento das fases de carbono não-diamante ( $\text{sp}^2$ ). Este aumento é justificado pelo facto de existir, no interior do reator, uma maior razão  $\text{CH}_4/\text{H}_2$ , o que se traduz numa maior quantidade de espécies  $\text{CH}_x$  na fase gasosa e menor quantidade de H atómico, o qual é responsável pela eliminação das espécies de carbono não-diamante formadas na superfície do filme. Outro fator que contribui para a diminuição da cristalinidade dos filmes de diamante é o aumento da pressão, tal como se pode verificar através da amostra D, obtida a 150 mbar. A amostra E apresenta um pico do plano (111) do diamante bastante mais largo comparativamente às restantes amostras, o que sugere uma maior desordem cristalográfica, bem como uma maior dispersão no tamanho médio da cristalite. Tendo em conta os difractogramas apresentados é possível concluir que as condições de deposição são extremamente importantes para o crescimento dos planos (111) do diamante. Segundo a literatura é nestes planos que ocorre a incorporação preferencial do boro [81]. Assim, é evidente que a dopagem com boro é mais eficiente em condições de menor fluxo de  $\text{CH}_4$  e menor pressão, condições estas que favorecem o crescimento dos planos (111).

A tabela 8 descreve os respetivos tamanhos médios de cristalite obtidos por *Low incident beam angle diffraction* (LIBAD). Desta forma, é possível verificar que as amostras A e C apresentam um tamanho médio de cristalite de 143 nm e 71 nm, respetivamente. Por outro lado, as amostras B, D, E e F possuem um tamanho médio de cristalite típico da microestrutura NCD (28 nm, 25 nm, 16 nm e 12 nm, respetivamente).

**Tabela 8** - Tamanho médio de cristalite das amostras A a F, obtidos por LIBAD.

<i>Amostra</i>	<i>Tamanho médio de cristalite (nm)</i>
<b>A</b>	143
<b>B</b>	28
<b>C</b>	71
<b>D</b>	25
<b>E</b>	16
<b>F</b>	12

### 1.1.3. Espectroscopia de Refletância

A espessura (d) das amostras foi obtida por uma técnica ótica não destrutiva, a Espectroscopia de Refletância. A partir dos espectros de refletância e considerando que o índice de reflexão (n) para o diamante se encontra entre 2,35 e 2,5 (valores típicos do diamante CVD micro e nanocristalino) foram calculadas as espessuras dos filmes recorrendo à equação:

$$d = \frac{1}{2\Delta v \cdot n}$$

Onde  $\Delta v$  é a diferença no número decimal entre máximos consecutivos no espectro de refletância.

Na tabela 9 apresentam-se os valores calculados da espessura dos dois conjuntos de amostras utilizados nos ensaios de imersão, em regime estático (conjunto 1) e em regime dinâmico (conjunto 2).

**Tabela 9** – Espessura obtida para os filmes de diamante dopados com boro. \* - Não foi possível realizar a medição.

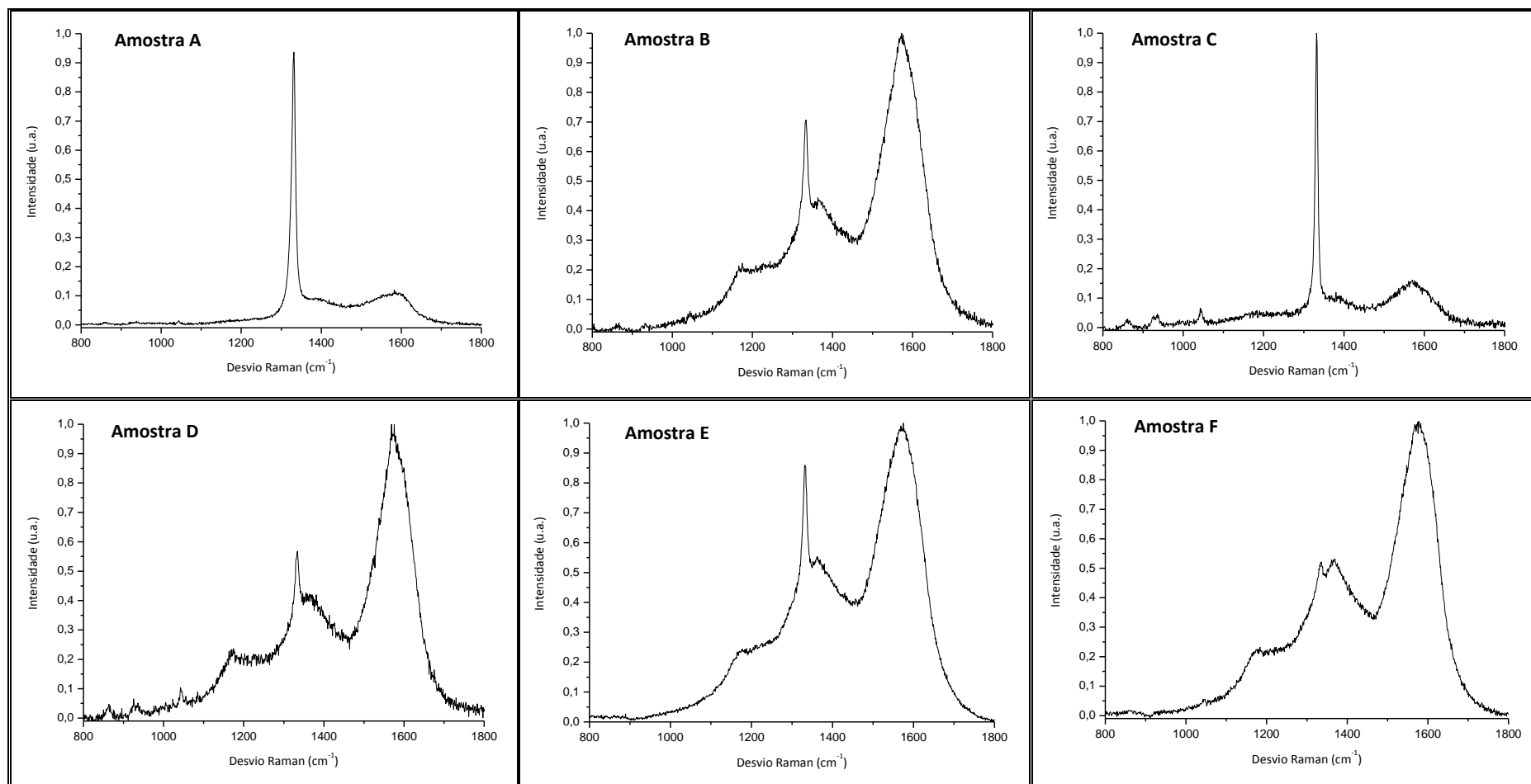
	<b>Amostra</b>	<b>Espessura do filme (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Conjunto 1</b>	A'	0,70 - 0,66
	B'	0,86 - 0,81
	C'	0,55 - 0,51
	D'	*
	E'	1,93 - 1,82
	F'	0,59 - 0,55
<b>Conjunto 2</b>	A	0,82 - 0,78
	B	0,77 - 0,73
	C	0,52 - 0,49
	D	*
	E	1,49 - 1,40
	F	0,68 - 0,64

Através da análise dos dados da tabela 9 podemos concluir que as amostras utilizadas em ambos os conjuntos apresentam espessuras semelhantes. Refira-se ainda que de todas as amostras obtidas, os conjuntos C'/C e E'/E são os que apresentam as amostras com menor e maior espessura, respetivamente. Para o conjunto de amostras D'/D não foi possível obter uma estimativa da espessura. Este facto pode dever-se a uma maior dispersão de luz por parte das amostras e/ou a uma maior espessura das mesmas, acima dos valores que o procedimento experimental adotado permite obter. As pequenas variações de espessura observadas em algumas amostras dos dois conjuntos (em particular nas amostras A'/A e E'/E) podem ter origem em flutuações nas condições de deposição (temperatura do substrato, fluxo de gases, etc), facto este originado pela deposição das amostras sem rotação do substrato. De facto, a geometria do próprio reator poderá influenciar as características finais dos filmes de diamante [83, 84].

#### 1.1.4. Espectroscopia Raman

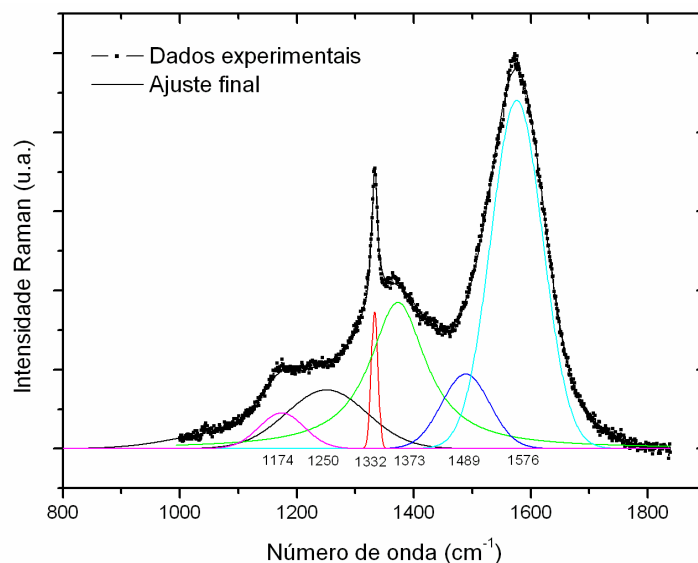
Para uma melhor compreensão da microestrutura dos filmes de diamante foram obtidos espectros Raman da superfície das amostras (figura 21).

A análise aos espectros Raman da figura 21 comprova a existência de dois tipos de microestrutura: filmes essencialmente compostos pela fase  $sp^3$  de carbono (fase diamante) como é o caso das amostras A e C e as restantes em que a fase de carbono dominante é a de não-diamante ( $sp^2$ ). De facto, de acordo com o ajuste típico efetuado aos espectros Raman (figura 22), verificamos que os espectros Raman das amostras A e C são dominados pelo pico  $1332\text{ cm}^{-1}$  do diamante [71], o qual está de acordo com a sua estrutura típica MCD, com tamanhos médios de cristalite da ordem dos 143 nm e 71 nm, respetivamente. Relativamente às restantes amostras (B, D, E e F), os espectros são dominados pelas bandas D (grafite desordenada) e G (grafite cristalina) da grafite, a  $1380$  e  $1580\text{ cm}^{-1}$ , respetivamente [29, 58]. O aumento da intensidade destas bandas nas amostras B, D, E e F, relativamente às amostras MCD, é justificado pelo aumento do número de fronteiras de grão e aumento do fluxo de  $CH_4$  das amostras NCD. De facto, com a redução do tamanho de cristalite, o número de fronteiras de grão aumenta ao mesmo tempo que o aumento do fluxo de  $CH_4$  dificulta a função do H atómico na remoção das fases  $sp^2$  da superfície, durante o processo CVD. Podemos ainda verificar nos diversos espectros das amostras NCD, a presença de outros picos típicos das estruturas nanocristalinas de diamante: os segmentos de trans-poliacetileno (TPA), aos  $1170\text{ cm}^{-1}$  e aos  $1480\text{ cm}^{-1}$ , aproximadamente [29, 71]. Relativamente à banda  $1250\text{ cm}^{-1}$ , esta foi co-relacionada com as bandas TPA [81] e encontra-se quase sempre presente em filmes tipicamente NCD.



**Figura 21** - Espectros Raman obtidos a partir da superfície das amostras A a F.





**Figura 22** - Figura ilustrativa do gráfico de ajuste realizado aos picos presentes nos espectros Raman das amostras A a F.

Apesar da Espetroscopia Raman ser uma técnica essencialmente qualitativa, é possível obter uma estimativa quantitativa da pureza cristalina dos filmes de diamante. Essa quantificação pode ser obtida pela determinação da “Figura de mérito” (FOM – *figure of merit*) do filme de diamante recorrendo à equação 1 da secção 4.3., do Capítulo II.

Estes valores encontram-se descritos na tabela 10 e foram obtidos para os conjuntos de filmes A a F e A’ a F’. É imediatamente evidente que as amostras A/A’ e C/C’ apresentam a melhor qualidade cristalina com praticamente uma ordem de grandeza superior às restantes. Este facto está de acordo com o que seria de esperar para filmes de diamante crescidos em ambientes mais ricos em H. Não obstante, as amostras A/A’ apresentam um conteúdo de fases  $sp^3$  ligeiramente superior às amostras C/C’, o que é justificado pela menor pressão de deposição utilizada na amostra A (25 mbar). De facto, com a redução da pressão, o tempo de permanência das espécies  $CH_x$  na câmara diminui, reduzindo-se, desta forma, a incorporação destes radicais no filme de diamante. Relativamente às restantes amostras (B/B’, D/D’, E/E’ e F/F’), não se verifica uma grande variação de conteúdo de fases  $sp^2$ , apesar das amostras F/F’ serem aquelas que apresentam a menor qualidade cristalina. De facto, as amostras F/F’ foram obtidas com o

maior fluxo de CH<sub>4</sub> e maior pressão, parâmetros estes que contribuem para o aumento de incorporação de fases de carbono sp<sup>2</sup> com redução do tamanho da cristalite.

**Tabela 10** - Tabela ilustrativa dos valores de FOM obtidos para os dois conjuntos de amostras.

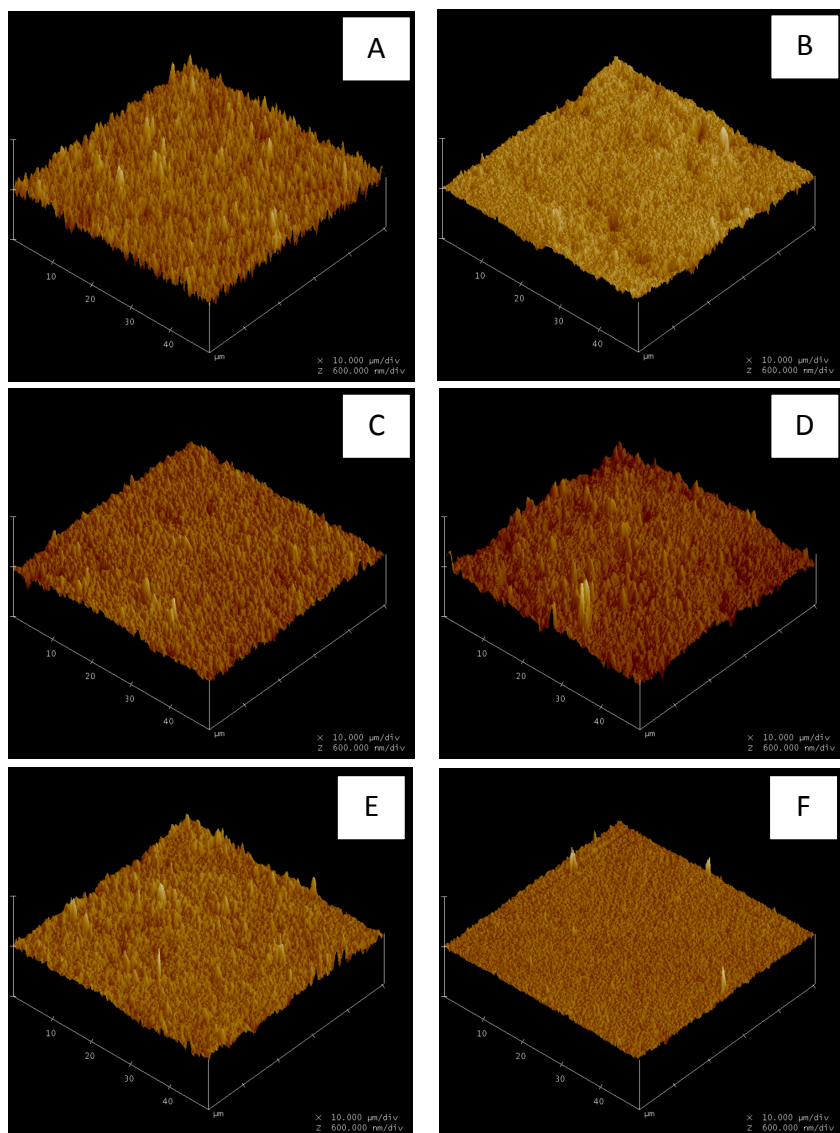
<i><b>Amostra</b></i>	<i><b>A/A'</b></i>	<i><b>B/B'</b></i>	<i><b>C/C'</b></i>	<i><b>D/D'</b></i>	<i><b>E/E'</b></i>	<i><b>F/F'</b></i>
<b>FOM</b>	32,31	3,30	21,04	4,59	3,66	2,69

## **1.2. Caracterização superficial**

### **1.2.1. Microscopia de força atômica (AFM)**

A figura 23 ilustra as imagens de AFM obtidas para as várias amostras em estudo e a tabela 11 a respetiva rugosidade da superfície, obtidas numa área de 50µm x 50µm representativa das superfícies.

Através da análise da figura 23 e da tabela 11 é possível verificar que a amostra E é aquela que apresenta uma maior rugosidade, sugerindo a existência de uma superfície com maior heterogeneidade (maior porosidade). De acordo com os resultados da análise de SEM e do tamanho médio de cristalite da amostra E, podemos concluir que esta maior rugosidade é devida à maior espessura do filme de diamante depositado. Neste sentido, a amostra F é aquela que apresenta um menor valor de  $R_{ms}$ , dado ser uma das amostras menos espessas e com um tamanho de cristalite mais pequeno.



**Figura 23** - Imagens de AFM obtidas para as amostras A a F.

**Tabela 11** - Tabela ilustrativa dos valores de rugosidade obtidos para as amostras A a F.

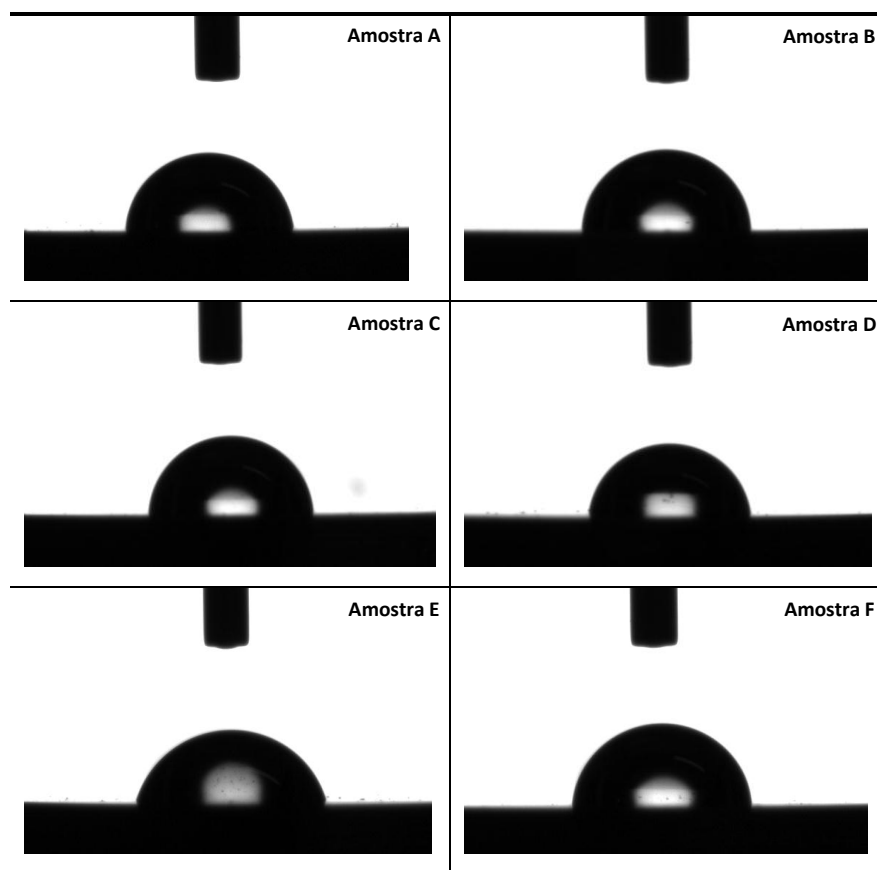
<i>Amostra</i>	<i>R<sub>ms</sub> (nm)</i>
A	51
B	74
C	35
D	55
E	78
F	16

### 1.2.2. Molhabilidade

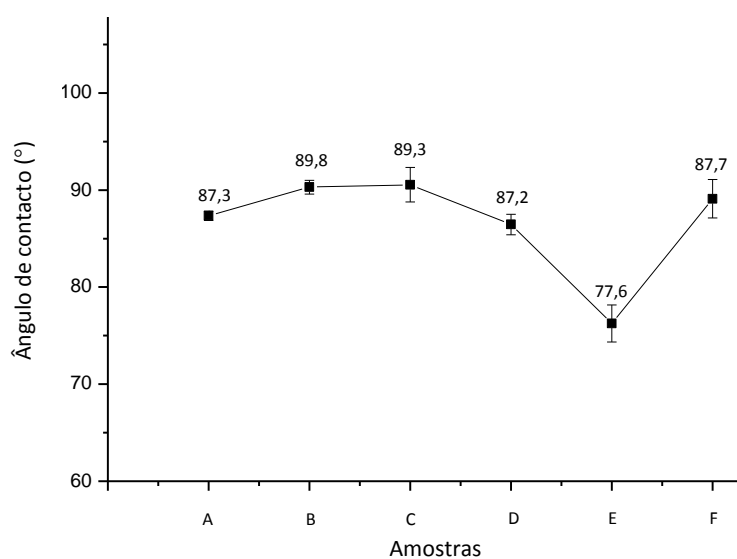
As imagens da figura 24 apresentam o ângulo de contacto ( $\theta$ ) da micro gota de água, 30 segundos após o contacto com a superfície das amostras A a F. No gráfico da figura 25 são apresentados os valores médios de  $\theta$  obtidos para este conjunto de amostras. A partir deste gráfico concluímos que todas as amostras apresentam, após o processo CVD, características hidrofílicas, com valores de  $\theta < 90^\circ$ . Contudo, com exceção da amostra E, os valores de  $\theta$  aproximam-se bastante do limite de hidrofilicidade ( $90^\circ$ ). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por outros autores em que filmes de diamante CVD terminados em hidrogénio apresentam ângulos de contacto para a água em torno dos  $90^\circ$  [85]. Visto que a modificação das terminações destes filmes para oxigénio reduz bastante o ângulo de contacto, os filmes terminados em hidrogénio (os que apresentam valores de  $\theta$  em torno dos  $90^\circ$ ) são normalmente referenciados de hidrofóbicos. Neste caso, em concreto, a presença de superfícies terminadas em H é explicada pelo processo de deposição e arrefecimento a que foram sujeitos os filmes de diamante no reator HFCVD. De facto o H é o elemento mais abundante na câmara de deposição e é considerado o “motor” para o crescimento do próprio filme de diamante, uma vez que é o elemento responsável não só pela remoção das fases de carbono não-diamante ( $sp^2$ ) existentes na superfície do filme, mas também pela nucleação e crescimento de diamante, uma vez que reage com as espécies ativas ( $CH_x$ ) presentes no interior do reator (Figura 9, secção 6.1.2., Capítulo I). Além disso, após o processo de crescimento do filme, as amostras permanecem na câmara de deposição durante cerca de 30 minutos, numa atmosfera exclusivamente composta por H. Consequentemente, é inevitável que grande parte da superfície das amostras acabe terminada em átomos de H.

Relativamente à amostra E, o menor valor de  $\theta$  pode ser justificado de duas maneiras: aumento da porosidade (heterogeneidade) e/ou redução das terminações em H (aumento das terminações em O). De facto, reportando aos dados obtidos na análise de AFM é possível constatar que a amostra E é aquela que apresenta uma maior rugosidade (78 nm). Por outro lado, através da micrografia de SEM obtida é, igualmente, possível

verificar que esta amostra apresenta uma microestrutura menos regular quando comparada com as restantes amostras.



**Figura 24** - Ângulos de contacto das amostras A a F obtidos 30'' após o contacto da micro gota de água com a superfície.



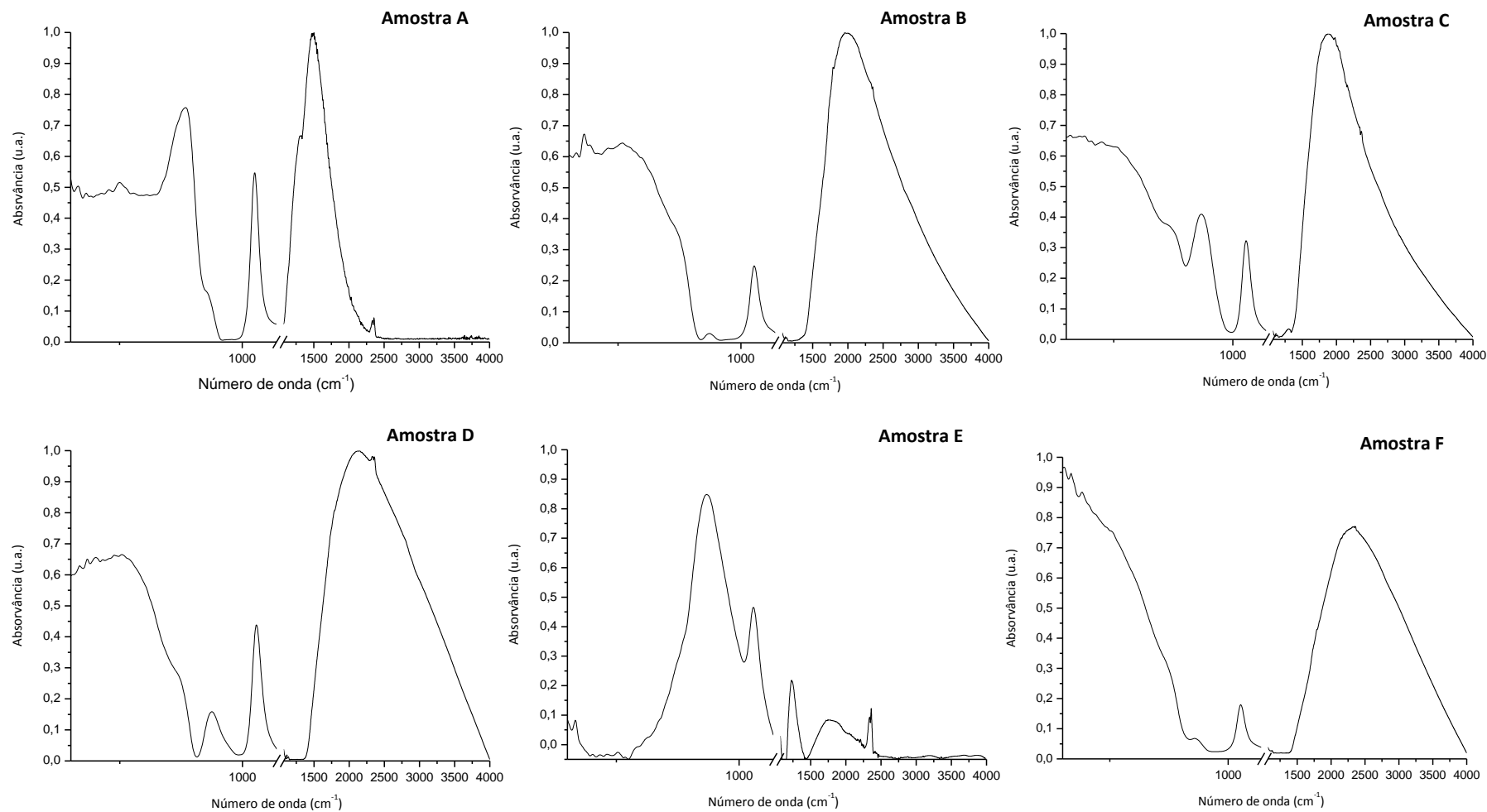
**Figura 25** – Gráfico dos ângulos de contacto das amostras A a F obtidos 30'' após o contacto da micro gota de água com a superfície.

### 1.2.3. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

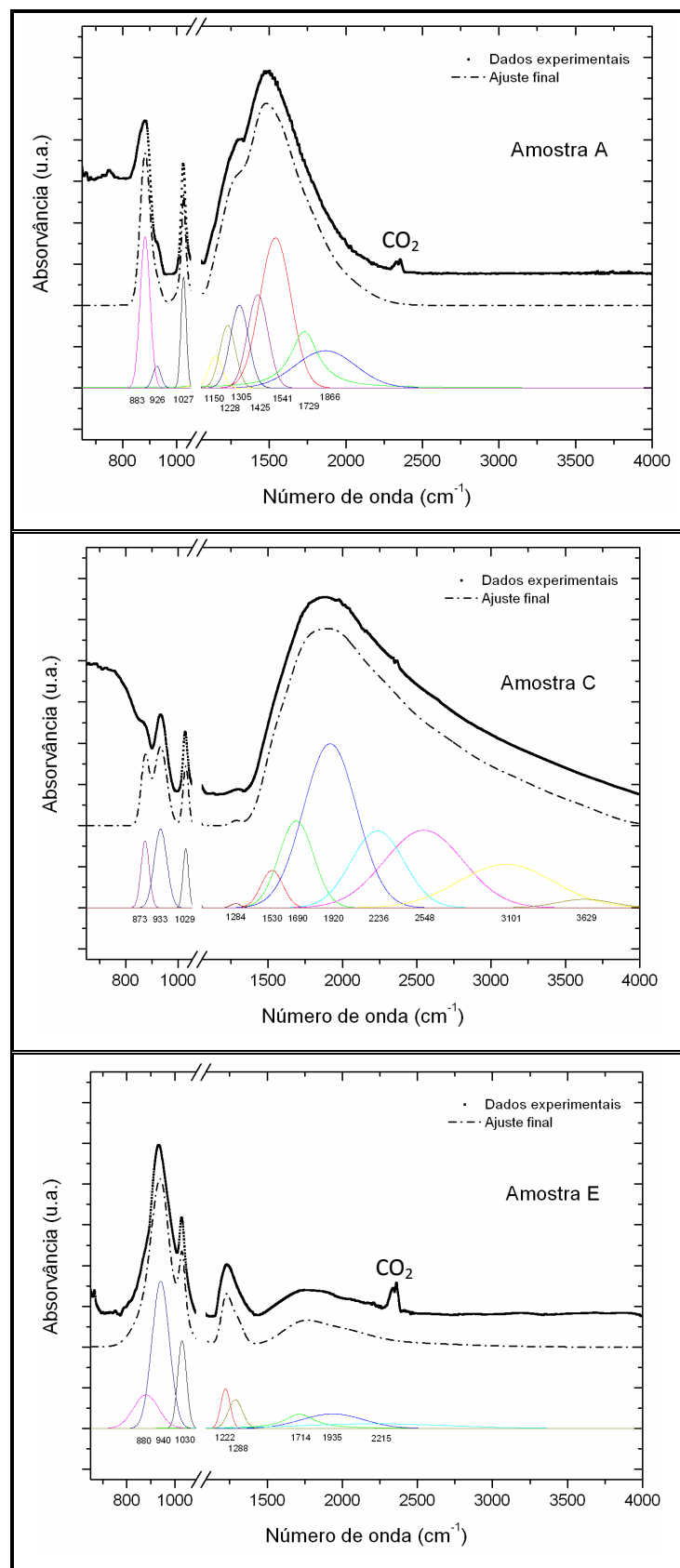
Os espectros de absorção no Infravermelho obtidos pela espectroscopia FTIR permitiram identificar as principais vibrações moleculares características de cada superfície e, desta forma, conhecer, tanto quanto possível, quais os grupos funcionais envolvidos nessas vibrações.

Uma primeira análise dos gráficos da figura 26 permite constatar que, com exceção das amostras A e E, os espectros FTIR são dominados por uma banda larga que começa em torno dos  $1500\text{ cm}^{-1}$  e pode estender-se até aos  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Além disso, todos os espectros da figura 26 apresentam abaixo dos  $1500\text{ cm}^{-1}$  outras absorções não tão intensas, mas largamente dependentes da amostra. A figura 27 mostra os ajustes realizados aos referidos espectros das amostras A, C e E.

A análise dos espectros FTIR da figura 26 permite diferenciar as amostras em dois grupos: aquele em que a absorção na região superior a  $2000\text{ cm}^{-1}$  é reduzida (caso das amostras A e E) e o grupo que apresenta elevada absorção nesta região (amostras B, C, D e F). Os gráficos apresentados na figura 27 referem-se aos ajustes realizados aos espectros FTIR das amostras A, C e E, amostras estas que mostram alterações de absorção no Infravermelho mais relevantes. Dado que a região  $2500\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  do IV corresponde às frequências de elongação do grupo  $\text{-OH}$ , conclui-se que estas terminações devem dominar na superfície do segundo grupo de amostras. Assim, o ajuste dos espectros nesta região ( $2500\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ ) foi conseguido com duas bandas largas, uma centrada em  $\approx 2550\text{ cm}^{-1}$  e outra em  $\approx 3630\text{ cm}^{-1}$ . Desta forma, a presença destes grupos nestas amostras (B, C, D e F) pode estar associada à formação de um qualquer álcool/fenol ou até a um ácido carboxílico na superfície. Estas superfícies terminadas em  $\text{-OH}$  podem ser, consequentemente, mais hidrofóbicas, justificando assim os maiores valores do ângulo de contacto (Figura 25). Nesta mesma região é normal encontrarmos bandas estreitas associadas às vibrações de elongação da ligação C-H de vários hidrocarbonetos. Contudo, não são visíveis indícios destas vibrações em qualquer das amostras estudadas.



**Figura 26** – Gráficos dos espectros FTIR típicos das amostras A a F.



**Figura 27** - Figura ilustrativa dos ajustes realizados às bandas presentes nos espectros FTIR das amostras A, C e E.



Para além da absorção  $\text{--OH}$  observada na região  $2500\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$  é também observada, nas mesmas amostras, uma elevada absorção entre os  $1500\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ , com máximo entre os  $2000\text{--}2300\text{ cm}^{-1}$ . Como é visível no gráfico da amostra C, o melhor ajuste é obtido com três bandas a  $\approx 1700\text{ cm}^{-1}$ , a  $\approx 1920\text{ cm}^{-1}$  e a  $\approx 2240\text{ cm}^{-1}$ . De acordo com a literatura, a região  $2000\text{--}2300\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a vibrações de alongação das ligações  $\text{C}\equiv\text{C}$ , possivelmente do acetileno ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) formado e incorporado durante o processo CVD nas fronteiras de grão das amostras em causa. Já a banda a  $\approx 1920\text{ cm}^{-1}$  pode resultar de vibrações de alongação duplas do tipo  $\text{C}=\text{X}=\text{Y}$ . Sendo o boro e o oxigénio elementos presentes durante o processo CVD, estes podem ser incorporados nestas vibrações como X ou como Y. Podemos ainda identificar nos gráficos de ajuste da figura 27 uma banda com um máximo a  $\approx 1700\text{ cm}^{-1}$  observada em todas as amostras (com maior ou menor intensidade), a qual pode estar relacionada com a vibração de alongação das ligações  $\text{C}=\text{O}$ , por exemplo de cetona, éster ou ácido carboxílico. De facto, nas amostras A, E e F esta banda é bastante mais fraca comparativamente às restantes amostras. Particularmente na amostra A, é possível identificar uma banda com um máximo a  $\approx 1540\text{ cm}^{-1}$  que poderá estar associada à vibração de alongação das ligações  $\text{C}=\text{C}$ . Sendo esta vibração dominante na amostra A, sugere estar associada à maior cristalinidade do filme de diamante. Nas amostras A e E surgem duas bandas com máximos a  $\approx 1230\text{ cm}^{-1}$  e a  $\approx 1300\text{ cm}^{-1}$ , as quais podem estar associadas a vibrações de alongação das ligações  $\text{C--O}$  e  $\text{C--O--C}$ . Assim, a maior prevalência de terminações em O, quer na forma de ligação  $\text{C--O}$ , quer na forma de ligação  $\text{C--O--C}$ , característica das amostras A e E, justifica a sua maior molhabilidade (Figura 25). De facto, as terminações em H presentes nas superfícies de diamante obtidas num meio redutor (hidrogénio atómico) podem ser facilmente oxidadas, em virtude da presença do  $\text{B}_2\text{O}_3$  no processo de deposição CVD, espécies estas que mesmo após o processo de arrefecimento realizado numa atmosfera exclusivamente de H, continuam presentes na superfície das amostras, podendo assim concluir-se que o arrefecimento não é completamente eficaz [76]. Relativamente à região  $650\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ , todas as amostras apresentam um pico (banda estreita) em torno dos  $1024\text{ cm}^{-1}$ . Este facto sugere que esta vibração não é proveniente da superfície, mas sim de um defeito pontual característico das amostras na rede

cristalina do diamante. Nesta mesma região ocorrem as vibrações bending C–H, normalmente entre os 650-860  $\text{cm}^{-1}$ . De facto, com exceção da amostra E, todas as amostras apresentam absorção nesta região. Além disso, é também possível identificar dois picos dominantes nas amostras A, C e E a  $\approx 880 \text{ cm}^{-1}$  e a  $\approx 940 \text{ cm}^{-1}$ . Relativamente ao pico que se observa em torno dos 880  $\text{cm}^{-1}$  não é possível correlacioná-lo corretamente com uma vibração específica. Contudo, dado que ocorre na região das vibrações C–H, pode estar relacionado com a ligação de hidrogénio ao carbono. Quanto ao pico 940  $\text{cm}^{-1}$ , este pode ter origem nas vibrações bending –OH, por exemplo, de um ácido carboxílico. Contudo, estas vibrações, a existirem, deverão ter origem em grupos –OH presentes nas fronteiras de grão dos filmes de diamante e não à superfície. Pois, só assim é possível manter a maior hidrofiliabilidade da amostra E.

## **2. Caracterização das amostras após imersão na solução fisiológica I**

Uma vez que os materiais desenvolvidos se destinam a ser aplicados em dispositivos biossensores implantáveis é crucial o estudo da sua bioinércia, quando em contacto com o meio fisiológico. Como primeiro estudo foi preparada uma solução de SBF com uma concentração de BSA de 2,5g/dl (solução fisiológica I). Assim, os dois conjuntos de amostras (A a F e A' a F') permaneceram em contacto com a respetiva solução por períodos de 10, 20 e 30 dias, tendo o conjunto A a F permanecido em regime dinâmico, enquanto que o conjunto A' a F' permaneceu em regime estático.

Tendo em conta que os resultados obtidos para as amostras B'/B e D'/D foram bastante semelhantes no decorrer das diversas análises, optou-se por apresentar apenas os resultados da amostra D'/D.

Após o término de cada um dos períodos de imersão, as amostras foram limpas com água destilada e secas numa estufa durante alguns minutos. A superfície das

amostras foi então analisada de forma a identificar eventuais alterações morfológicas, químicas e elétricas, assim como de adesão de compostos iónicos.

## **2.1. Caracterização superficial**

### **2.1.1. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)**

As micrografias de SEM das figuras 28 e 29 ilustram a evolução da superfície das amostras ao longo dos diferentes ensaios de imersão em regime estático e dinâmico, respetivamente. Estas imagens mostram que houve uma cobertura gradual da superfície de cada uma das amostras tanto no regime estático, como no regime dinâmico (zonas mais escuras). Ao mesmo tempo, observa-se uma degradação da morfologia cristalina dos filmes (mais evidente nas amostras MCD (A e C)). De facto, nestas amostras, as faces originais bem definidas e uniformes das cristalites são substituídas, logo após os 10 dias de imersão, por faces irregulares. Esta evidência sugere a existência de um processo de adesão de identidades presentes na solução fisiológica I. Não obstante, os dados apresentados na figura 28 indicam que após os 10 dias de imersão, a amostra C' é a que apresenta uma menor cobertura e alteração da sua superfície. Por outro lado, após os 30 dias de imersão, as amostras D' e E' parecem apresentar maior área superficial afetada pela solução fisiológica. Este facto pode estar diretamente relacionado com a maior hidrofilicidade destas duas amostras (ângulos de contacto de  $87,2^\circ$  e  $77,6^\circ$ , respetivamente), o que favorece a adesão de identidades presentes na solução. Uma dessas identidades pode muito bem ser a proteína BSA, que entrando em contacto com a superfície de diamante forma os aglomerados observados como zonas mais escuras nas imagens de SEM.

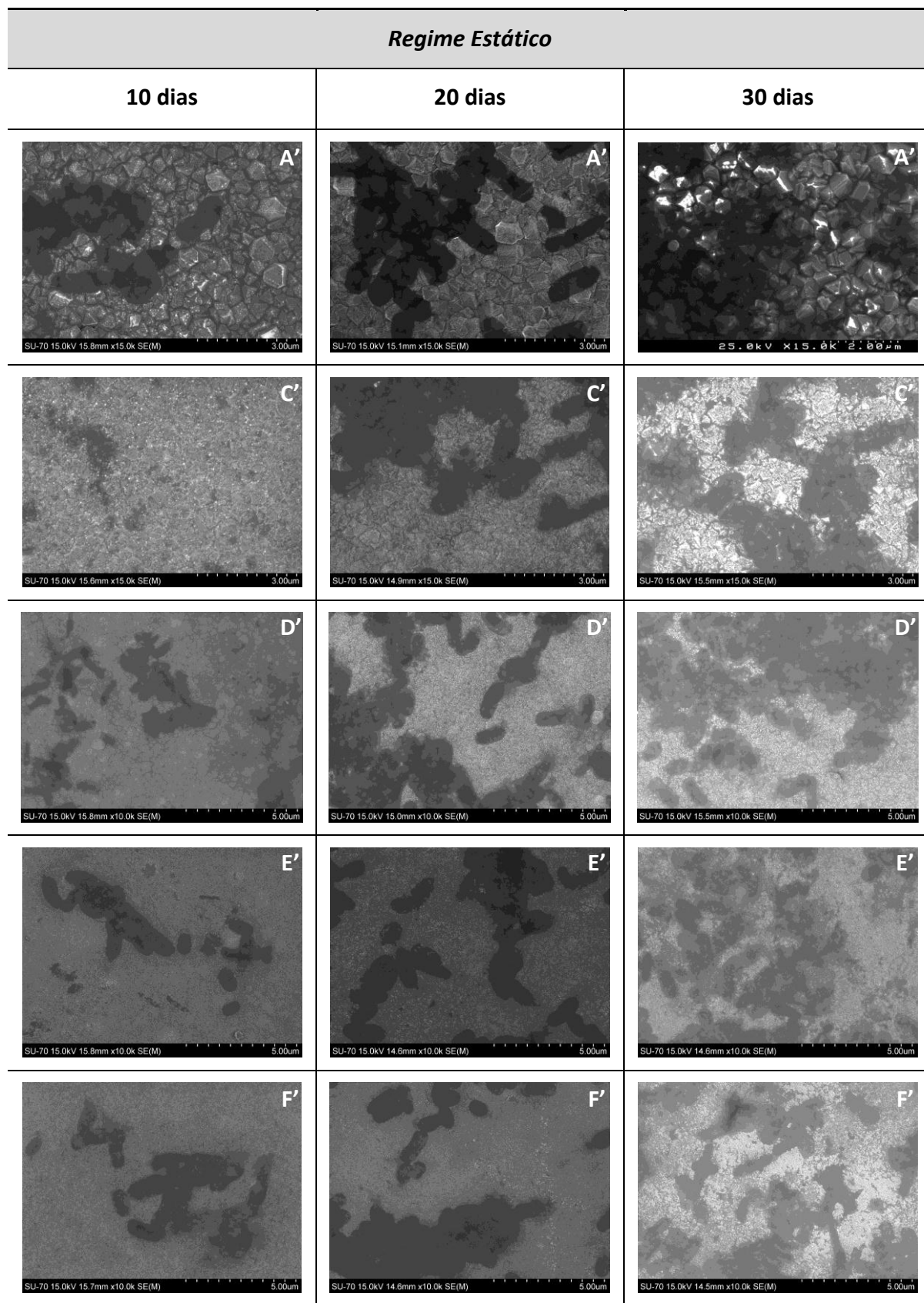
Relativamente às amostras em regime dinâmico, a formação das referidas zonas escuras parece não ser tão pronunciada, a partir dos 10 dias de imersão, quando comparadas com as correspondentes amostras no regime estático. Não obstante, as amostras A e C continuam a evidenciar alterações morfológicas na superfície das suas cristalites. De todas as amostras estudadas neste regime, as amostras E e F são as que

evidenciam maior cobertura das suas superfícies após os 30 dias, enquanto que é a amostra E a amostra mais afetada após os 20 dias de imersão. Este facto pode, mais uma vez, ser justificado pelo menor ângulo de contacto desta amostra.

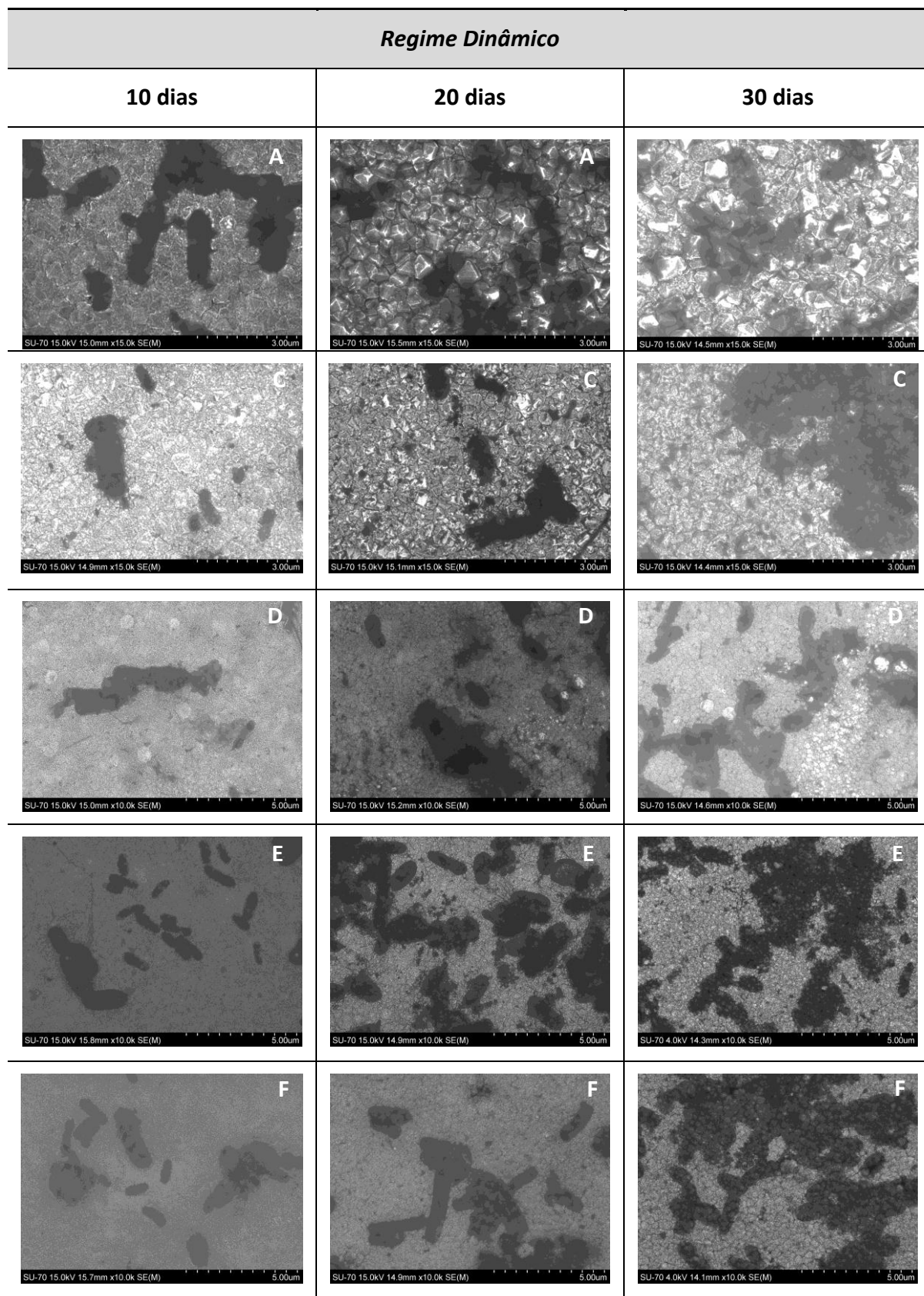
Quanto aos dois regimes estudados, podemos concluir que não parece existir uma significativa influência da rugosidade da amostra na degradação da superfície. De facto, as amostras mais e menos rugosas (a E'/E e a F'/F, respetivamente) apresentam alterações superficiais semelhantes nos dois regimes. Já o fluxo da solução fisiológica parece ter alguma influência na alteração da superfície das amostras. As amostras sujeitas a um fluxo constante da solução evidenciam uma ligeira redução na degradação da sua superfície.

### **2.1.2. Espectrometria de energia dispersiva (EDS)**

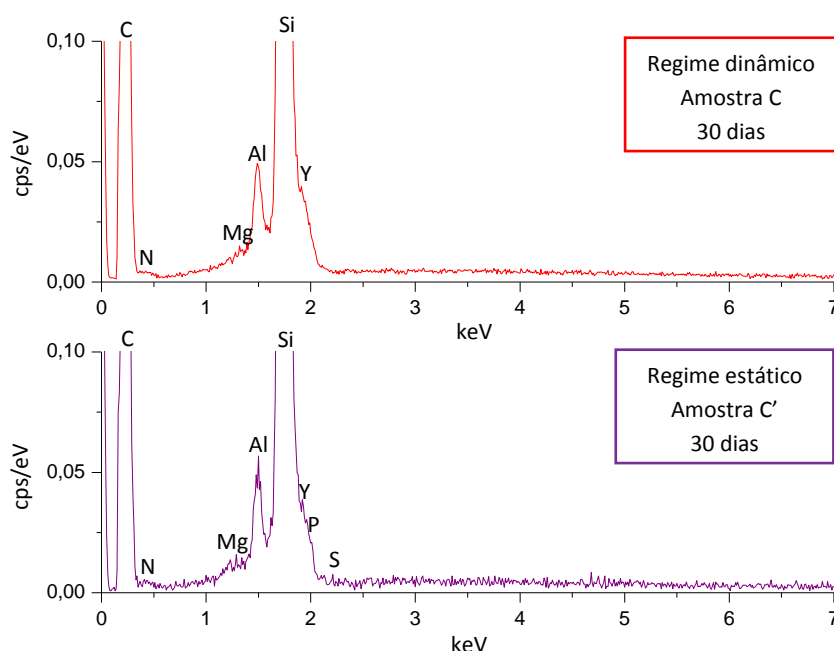
De forma a identificar a composição química dos diversos elementos observados nas imagens de SEM foram obtidos espectros de EDS da superfície de cada uma das amostras, após os 30 dias de contacto com a solução fisiológica I. Uma vez que os espectros obtidos ao longo das várias análises revelaram-se muito semelhantes, optou-se por colocar apenas um espectro de EDS da amostra onde se verificou maior alteração química elementar da superfície, tanto para o regime dinâmico, como para o regime estático (figura 30).



**Figura 28** - Micrografias de SEM das amostras A', C', D', E' e F' após a imersão, em regime estático, na solução fisiológica I.



**Figura 29** - Micrografias de SEM das amostras A, C, D, E e F após a imersão, em regime dinâmico, na solução fisiológica I.



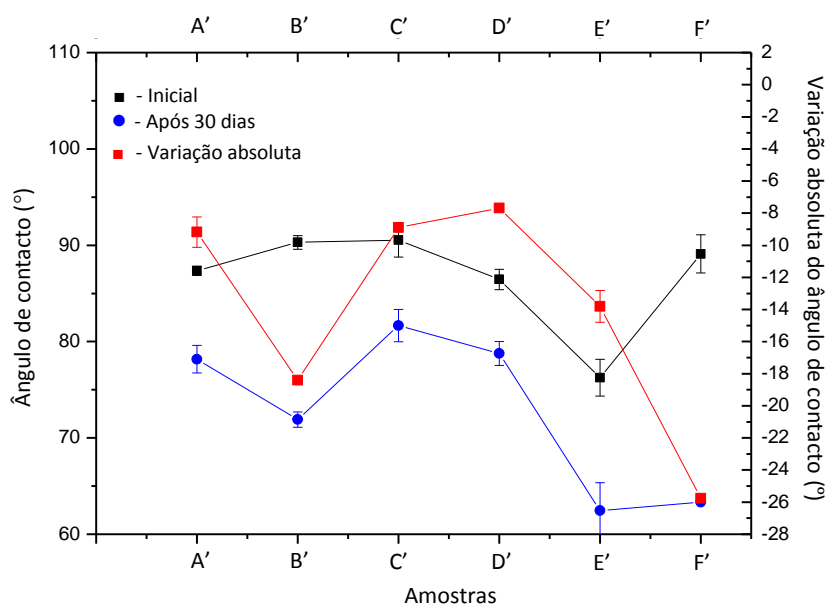
**Figura 30** - Espectros de EDS das amostras C/C' após os 30 dias de contacto com a solução fisiológica I em regime dinâmico e em regime estático, respetivamente.

Através da análise de ambos os espectros é possível identificar os picos relativos aos elementos constituintes do substrato  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , nomeadamente, o alumínio (Al), a ítria (Y), o silício (Si), o azoto (N) e, ainda, o carbono (C) do filme de diamante. Para além destes elementos, dominantes nos espectros EDS, são observados indícios da presença de outros elementos, nomeadamente, o magnésio (Mg), o fósforo (P) e o enxofre (S), com maior relevância na amostra C' relativa ao regime estático. Contudo, a fraca intensidade destes picos sugere que estes estejam presentes em concentrações demasiado baixas, muito próximas do limite de deteção do equipamento utilizado.

### 2.1.3. Molhabilidade

Com o objetivo de avaliar a superfície das diversas amostras, após 30 dias de imersão na solução fisiológica I, foram efetuadas medidas do ângulo de contacto. Os gráficos das figuras 31 e 32 representam os ângulos de contacto da micro gota de água com a superfície das amostras, antes e após o contacto com a solução fisiológica I, em

regime estático e dinâmico, respetivamente. Nestes gráficos encontra-se ainda representada a variação absoluta dos respetivos ângulos de contacto.



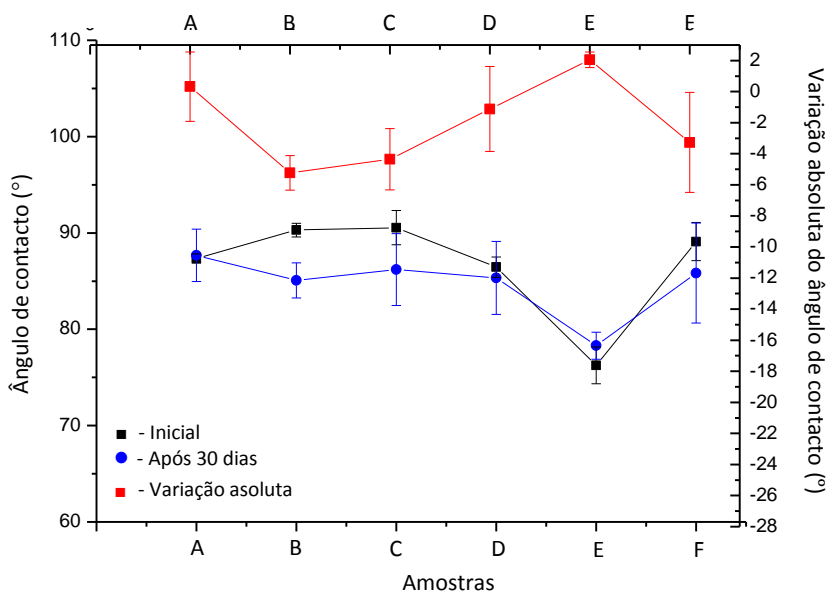
**Figura 31** - Gráfico dos ângulos de contacto e respetiva variação absoluta obtidos para as várias amostras (A' a F'), após 30 dias de imersão na solução fisiológica I, em regime estático.

Através da análise do gráfico da figura 31 podemos constatar que após a imersão na solução fisiológica I, em regime estático, o ângulo de contacto de todas as amostras diminuiu. Isto significa que, de um modo igual, houve um aumento da hidrofilicidade das superfícies de diamante, com especial destaque nas amostras B', E' e F' com variações absolutas de -18°, -14° e -25°, respetivamente. Já as amostras A' e C' sofreram variações de cerca de -9°, enquanto que a amostra D' variou -8°. Este aumento de hidrofilicidade pode ser explicado pelo aumento do número de grupos polares presentes na superfície das amostras. Neste contexto, a adesão da proteína BSA parece justificar este aumento, muito provavelmente através da ligação das moléculas de água aos grupos -OH da proteína. Não obstante, o valor do ângulo de contacto poderá ser o resultado da soma de diversos fatores:

1. Conformação da proteína (forma como os grupos -OH da proteína se encontram expostos à água);
2. Quantidade de proteína adsorvida.



Por seu lado, os pontos 1. e 2. podem depender não só das terminações presentes na superfície da própria amostra (O ou H), bem como da rugosidade e da presença de fases de carbono não-diamante ( $sp^2$ ). Sendo assim, existem diversos fatores que podem influenciar o valor de  $\theta$ , exigindo para tal, um estudo bastante mais detalhado, que não foi possível realizar neste trabalho experimental. Contudo, e de acordo com os resultados apresentados nas tabelas 10 e 11, é possível concluir que as amostras com menor rugosidade ( $F'$ ) juntamente com as que apresentam menor valor de FOM (B, E e F) favorecem a adsorção da proteína BSA. Isto significa que a presença de grupos polares nestas amostras é mais elevado do que nas restantes, muito provavelmente devido ao maior número de fronteiras de grão característico neste tipo de amostras e, consequentemente, à presença de maior fases de carbono  $sp^2$ . Pode-se assim concluir que não é apenas o tipo de terminações da superfície que influencia a adsorção da proteína, mas a junção com a sua rugosidade e valor de FOM.



**Figura 32** – Gráfico dos ângulos de contacto e respetiva variação absoluta obtidos para as várias amostras (A a F), após 30 dias de imersão na solução fisiológica I, em regime dinâmico.

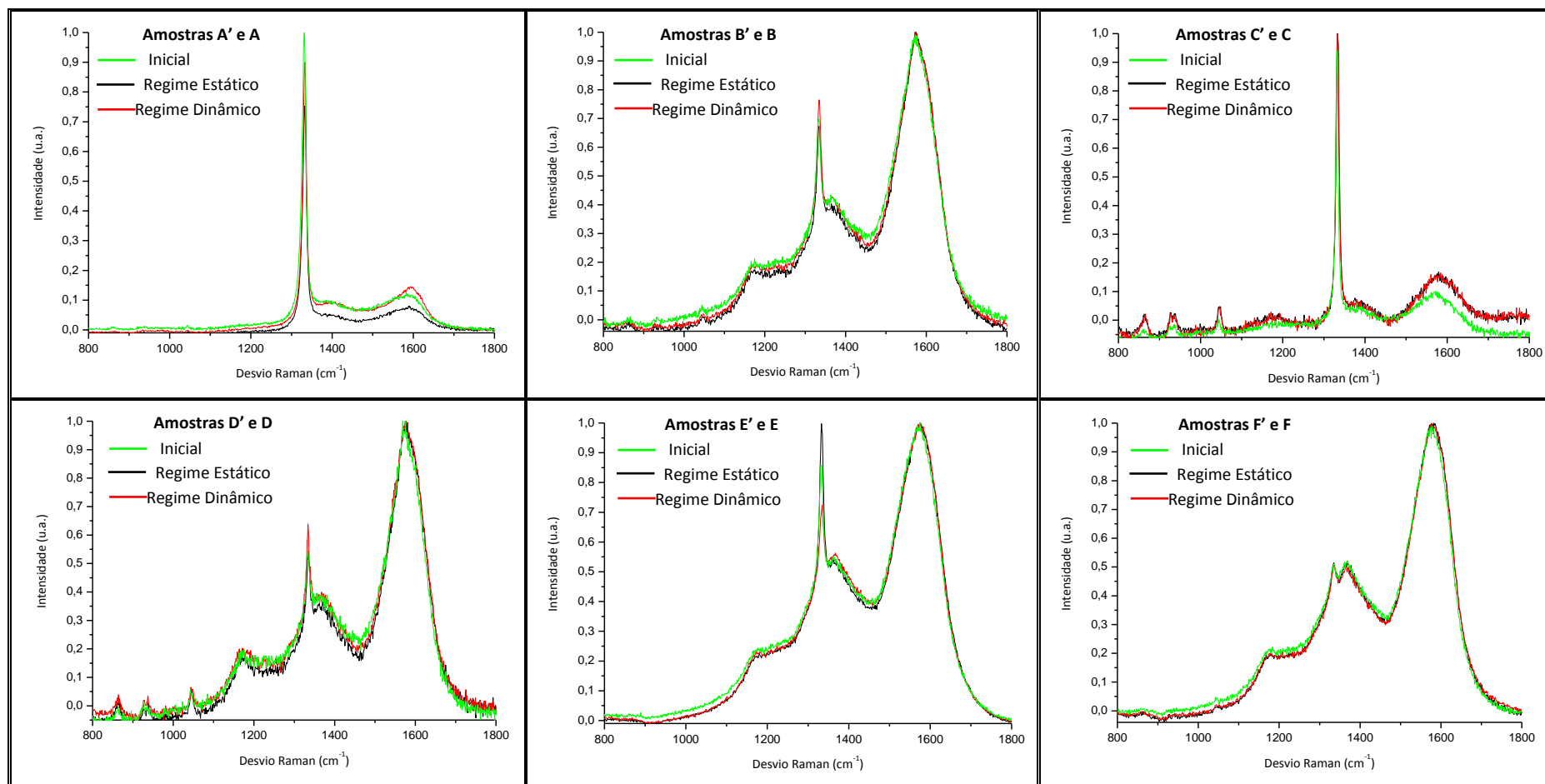
Relativamente às amostras em contacto com o fluido fisiológico, em regime dinâmico (figura 32), constata-se que não houve uma alteração significativa da superfície destas relativamente à hidrofiliicidade, uma vez que a variação máxima observada para  $\theta$  foi de apenas  $-5^\circ$ , para a amostra B. Contudo, devido às margens de erro calculadas nas

medições não foi possível fazer um estudo preciso sobre a variação entre as amostras deste conjunto. Este resultado parece contrariar o que foi observado nas correspondentes imagens de SEM (Figura 29) onde se deteta a acumulação de impurezas à superfície. Sendo assim, estes resultados indicam que a adsorção da proteína BSA é significativamente suprimida. Podemos, desta forma, concluir que a adsorção da proteína por parte das superfícies de diamante, quando o fluido fisiológico se encontra em regime dinâmico, não é significativamente influenciada pelas suas características morfológicas, microestruturais e químicas.

#### **2.1.4. Espetroscopia Raman**

De forma a avaliar a estrutura de cada uma das amostras após os ensaios de imersão, tanto em regime estático como em regime dinâmico, foram realizadas diversas análises por Espetroscopia Raman (figura 33).

Através da análise dos diversos espectros é possível concluir que ao fim dos 30 dias de imersão na solução fisiológica I, a superfície de cada uma das amostras não sofreu alterações significativas ao nível da sua microestrutura, continuando a observar-se a presença dos mesmos picos, de igual intensidade, quando comparados com aqueles presentes na análise efetuada inicialmente (Figura 21). As pequenas variações observadas, em particular no pico do diamante a  $1332\text{ cm}^{-1}$ , são devidas a pequenas heterogeneidades existentes na superfície do filme, bastante comuns em amostras criadas sem rotação do substrato. Pelo facto da análise Raman permitir estudar apenas a cristalinidade de alguns nanómetros, em profundidade, da superfície das amostras, os espectros da figura 33 indicam que a superfície das amostras não sofre significativas alterações estruturais.



**Figura 33-** Espectros obtidos por Espetroscopia Raman, em regime estático e em regime dinâmico, após 30 dias de imersão na solução fisiológica I.

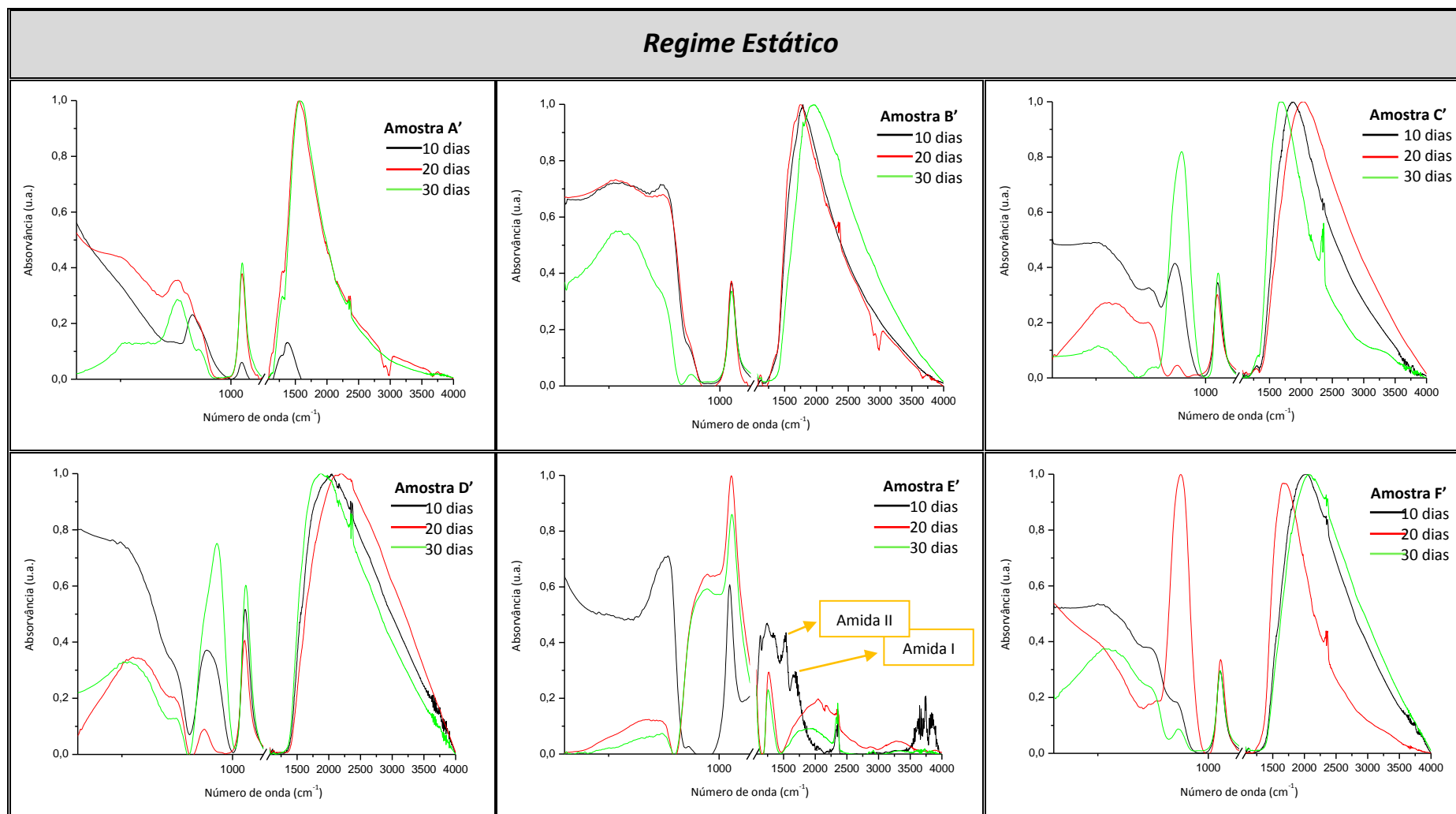
### **2.1.5. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

De forma a podermos estudar as alterações das superfícies relativamente à presença de grupos funcionais resultantes dos ensaios de imersão, em regime estático e em regime dinâmico, foram obtidos os gráficos das figuras 34 e 35.

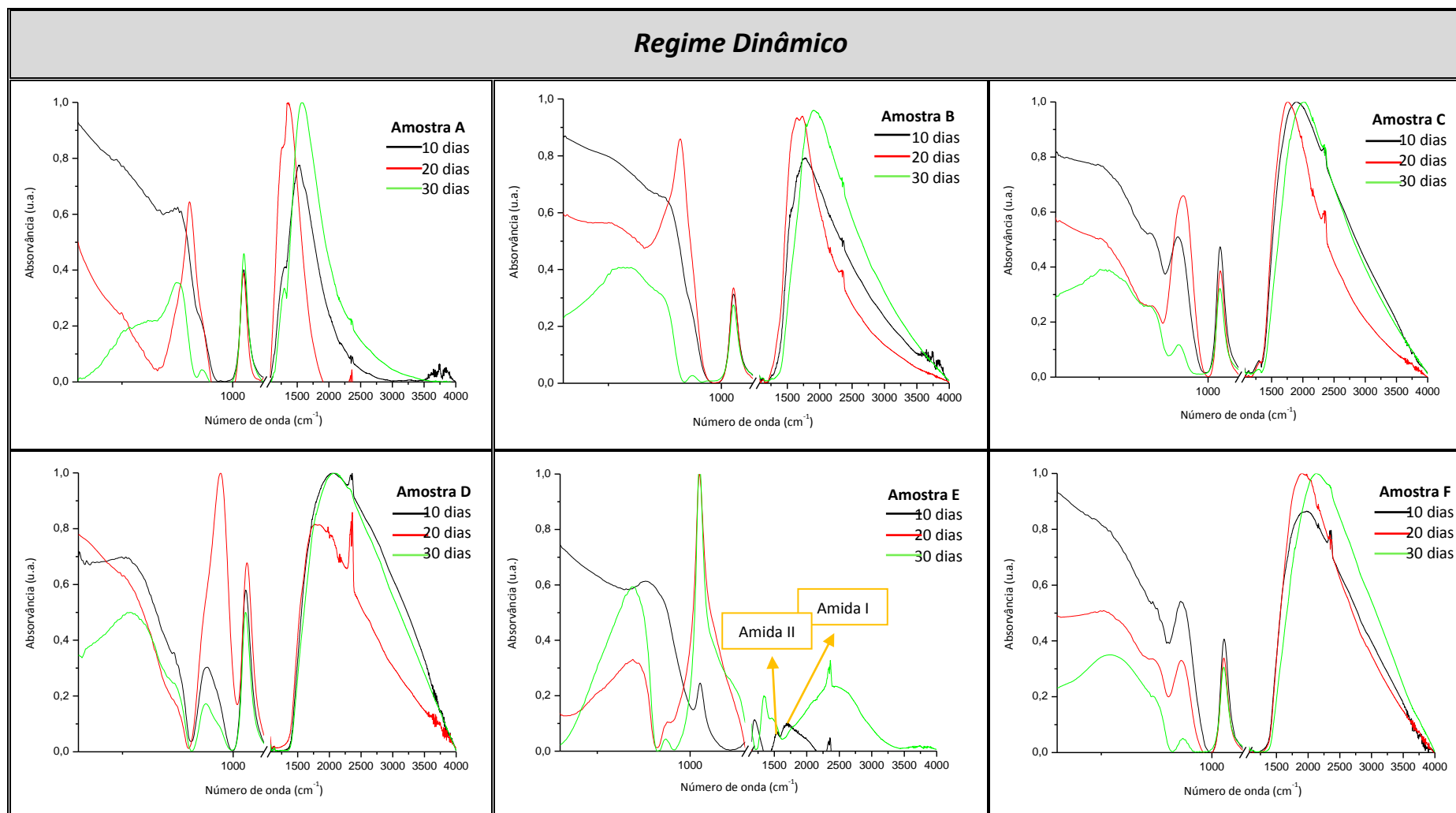
Assim, os espectros das figuras 34 e 35 colocam em evidência as variações de absorção no Infravermelho das diversas amostras, nos intervalos  $650\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$  e  $1200\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ , para os três tempos de imersão relativos aos regimes estático e dinâmico, respetivamente.

Para os regimes estático e dinâmico e no intervalo  $650\text{-}880\text{ cm}^{-1}$  é visível a existência de uma banda larga associada às ligações C–H da superfície das amostras, a qual, de um modo geral, apresenta uma diminuição de intensidade com o aumento do tempo de imersão. Tal facto pode sugerir um aumento da deposição de espécies iónicas na superfície do substrato, que se ligam aos átomos de H, bloqueando assim as vibrações C–H. É possível observar, ainda, a presença de uma banda estreita, comum a todas as amostras, entre os  $910\text{-}950\text{ cm}^{-1}$  que, de acordo com a literatura, pode estar associada às vibrações bending do grupo –OH. Tendo em conta a composição química da proteína BSA e das espécies iónicas presentes na solução e tendo, igualmente, em consideração que a referida banda apresenta diferentes intensidades ao longo dos vários períodos de imersão, tal facto sugere que esta banda estreita esteja associada, efetivamente, à adsorção de grupos –OH, incluídos na solução SBF, na superfície das amostras, com maior preponderância nas amostras C' e D', do regime estático.

Relativamente às amostras do regime dinâmico, a absorção desta banda no Infravermelho não é tão evidente, com exceção da amostra D. Em algumas amostras, como a C', a D' e a F', observa-se uma banda a  $\approx 940\text{ cm}^{-1}$  menos intensa aos 20 dias do que aos 10 dias, ou aos 30 dias menor do que aos 20 dias. Esta situação pode dever-se ao processo de limpeza que ocorre no fim de cada série de 10 dias e que pode acabar por remover a proteína BSA, bem como outros compostos iónicos que se encontram fracamente ligados à superfície e assim alterar o sinal FTIR.



**Figura 34** - Gráficos FTIR referentes às amostras A', C', D', E' e F' após imersão, em regime estático, na solução fisiológica I.



**Figura 35** - Gráficos de FTIR referentes às amostras A, C, D, E e F após imersão, em regime dinâmico, na solução fisiológica I.

Dado que os espetros FTIR de ambos os conjuntos de amostras apresentam uma banda bastante pronunciada no intervalo entre os 1500-3500  $\text{cm}^{-1}$ , tal situação não nos permitiu, com exceção das amostras E'/E e apenas nos primeiros 10 dias, observar os esperados picos relativos à proteína BSA, nomeadamente aos 1650  $\text{cm}^{-1}$  (Amida I) e aos 1540  $\text{cm}^{-1}$  (Amida II) [73]. A presença destes picos nas amostras E'/E pode ser justificada pelo carácter mais hidrofílico destas amostras.

### **3. Caracterização das amostras após imersão na solução fisiológica II**

Tendo em conta os resultados obtidos anteriormente e de forma a estudar qual a influência do efeito acumulativo da concentração da proteína BSA relativamente à adsorção desta na superfície dos filmes de diamante, optou-se por se realizar novos ensaios de imersão, desta vez, aumentando a concentração da referida proteína para 4g/dl, concentração esta mais próxima da encontrada no sangue de um ser humano saudável.

Esta análise é extremamente importante, uma vez que se pretende que estas superfícies sejam utilizadas na construção de biossensores implantáveis no corpo humano durante longos períodos de tempo. Assim, como forma de avaliar esta situação foram realizados novos ensaios de imersão com os mesmos conjuntos de amostras, logo após o estudo dos 30 dias. Contudo, neste segundo estudo, optou-se por se realizar ambos os ensaios de imersão apenas no regime estático, uma vez que foi neste regime que as amostras sofreram maiores efeitos da solução. Assim, enquanto que o conjunto de amostras relativas ao regime estático dos 30 dias foi colocado na nova solução durante mais 10 dias, o segundo conjunto, o das amostras relativas ao regime dinâmico, foi colocado na solução fisiológica II durante mais 20 dias. Tal como sucedeu na realização do primeiro estudo, os resultados das amostras B'/B e D'/D foram bastante semelhantes ao longo das diversas análises, pelo que se optou por expor apenas os resultados para as amostras D'/D.

### **3.1. Caracterização superficial**

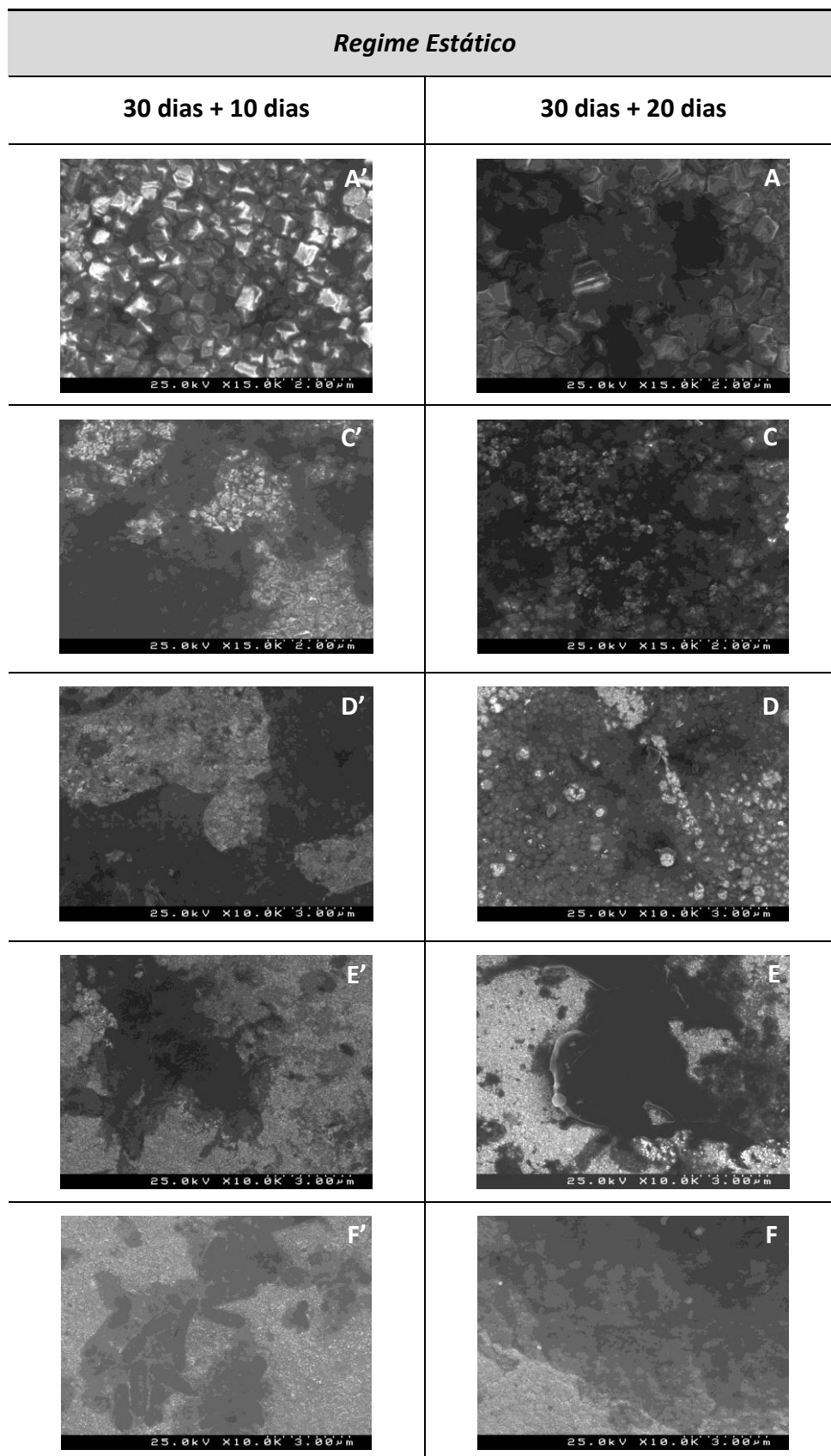
#### **3.1.1. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)**

A figura 36 ilustra várias micrografias de SEM, através das quais é possível observar a evolução da superfície das amostras ao longo dos diferentes ensaios de imersão na solução fisiológica II. Assim, podemos verificar que houve um aumento significativo da deposição de diversos elementos na superfície de cada uma das amostras para os 10 e 20 dias em contacto com a solução fisiológica II, quando comparadas com as amostras em contacto com a solução fisiológica I, durante 30 dias. Este facto é justificado pela maior concentração de proteína BSA utilizada na solução SBF e em virtude de se ter utilizado o regime estático, regime este que favorece a acumulação de espécies na superfície das amostras.

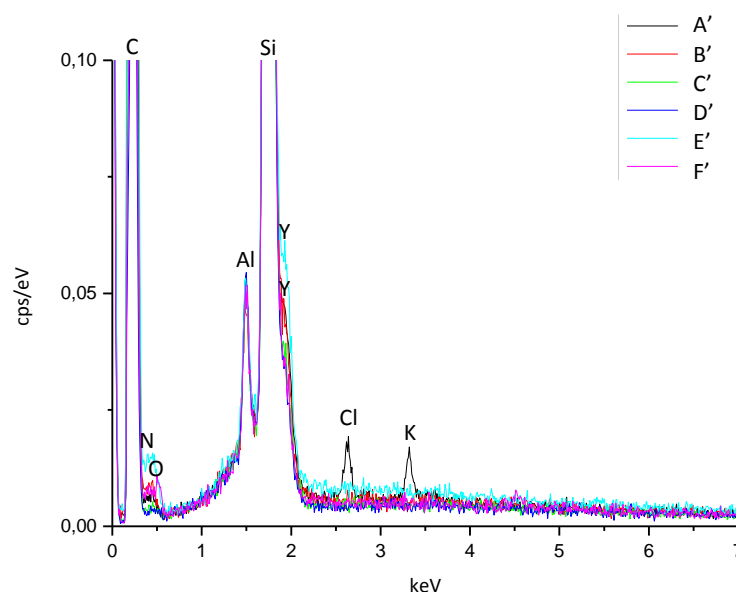
#### **3.1.2. Espectrometria de energia dispersiva (EDS)**

Na tentativa de identificar os vários compostos observados nas micrografias de SEM foram realizadas diversas análises de EDS às amostras em estudo (figuras 37 e 38).



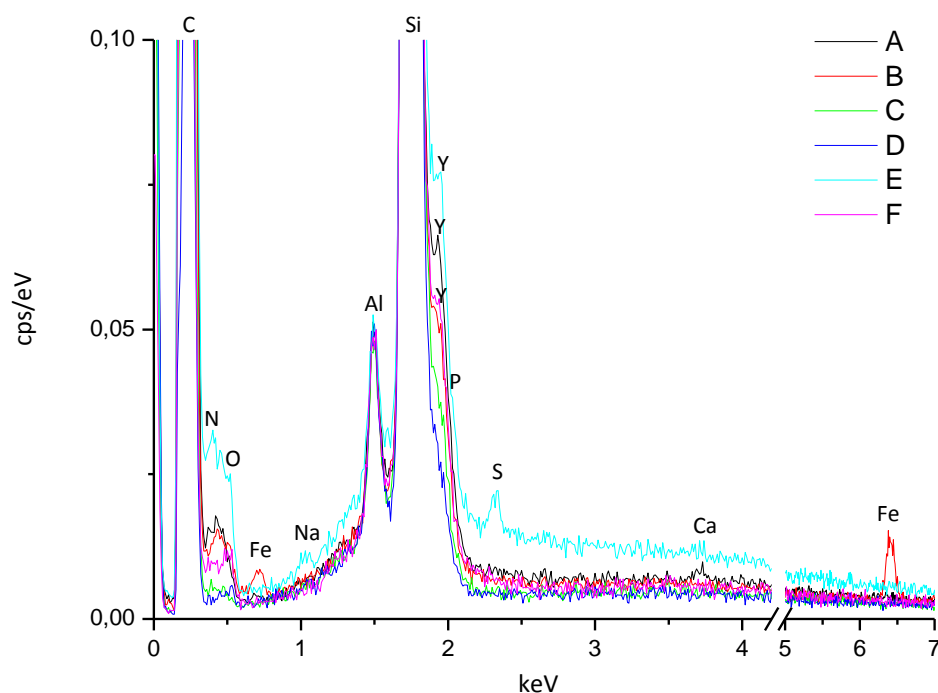


**Figura 36** - Figura ilustrativa das micrografias de SEM representativas das amostras MCD e NCD após a imersão destas na solução fisiológica II, em regime estático.



**Figura 37** - Gráficos dos espectros de EDS das amostras submetidas à solução fisiológica II, durante 10 dias.

Através da análise ao espectro da figura 37 podemos constatar que os resultados observados foram similares aos obtidos durante 30 dias na solução I, sendo possível identificar os picos referentes aos elementos constituintes do substrato  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , nomeadamente, o azoto (N), o alumínio (Al), o silício (Si), a ítria (Y) e o carbono (C) do diamante. Além destes elementos podemos observar um pequeno pico indicativo da presença de oxigénio (O), o qual, tendo em conta a composição química da proteína BSA, sugere a existência da adsorção desta na superfície das amostras. O facto de não se ter verificado a presença de outros elementos, (com exceção da amostra A', a qual apresentou os elementos cloro (Cl) e potássio (K)), sugere que a presença da proteína BSA pode inibir ou até mesmo impedir a adsorção de certos iões, presentes na solução fisiológica, na superfície das amostras, por meio do bloqueio dos locais de dissolução existentes na superfície destas [75]. No entanto, estes resultados, apoiados em conclusões já apresentadas por outros autores [73], não excluem a possibilidade da existência desses elementos. De facto, de acordo com o que já se encontra publicado, substratos de titânio, previamente imersos na solução fisiológica, podem encontrar-se revestidos por uma camada extremamente fina, a qual não consegue ser detetada nas análises de EDS [73].

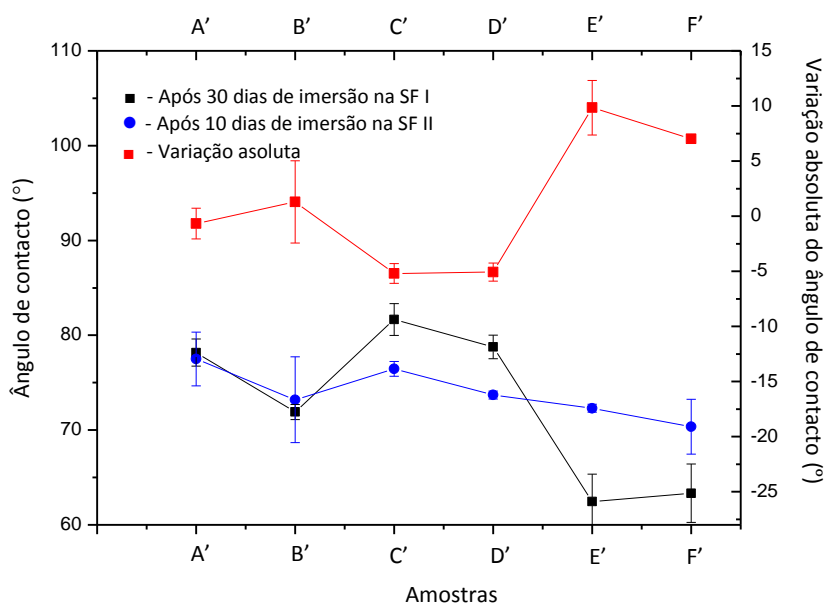


**Figura 38** - Gráfico dos espectros de EDS das amostras submetidas à solução fisiológica II, durante 20 dias.

Relativamente ao estudo dos 20 dias de imersão é possível identificar, na figura 38, a presença dos picos relativos aos elementos constituintes do substrato  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (C, N, Al, Si e Y), bem como a existência de um pico referente ao elemento oxigênio (O), o qual, tal como na análise de EDS realizada anteriormente, sugere a existência da adsorção da proteína BSA na superfície das amostras. Relativamente à amostra E foram identificados diversos picos relativos à adsorção de elementos na sua superfície, designadamente, o sódio (Na), o enxofre (S), o cálcio (Ca) e o ferro (Fe). O elemento cálcio foi, igualmente, detetado na superfície da amostra A. Por fim, parece existir um pequeno pico referente ao elemento fósforo (P), contudo a visualização deste é relativamente difícil devido à sobreposição de um forte pico pertencente à ítria (Y). Com exceção do Fe, o qual pode ter origem em alguma contaminação pelos parafusos utilizados no dispositivo hermético, os elementos Na, S e Ca têm origem na solução SBF. Desta forma, comprova-se que para tempos de imersão mais longos e para maiores concentrações da proteína BSA, e no regime estático, ocorre a precipitação de compostos formados por iões pertencentes à solução fisiológica.

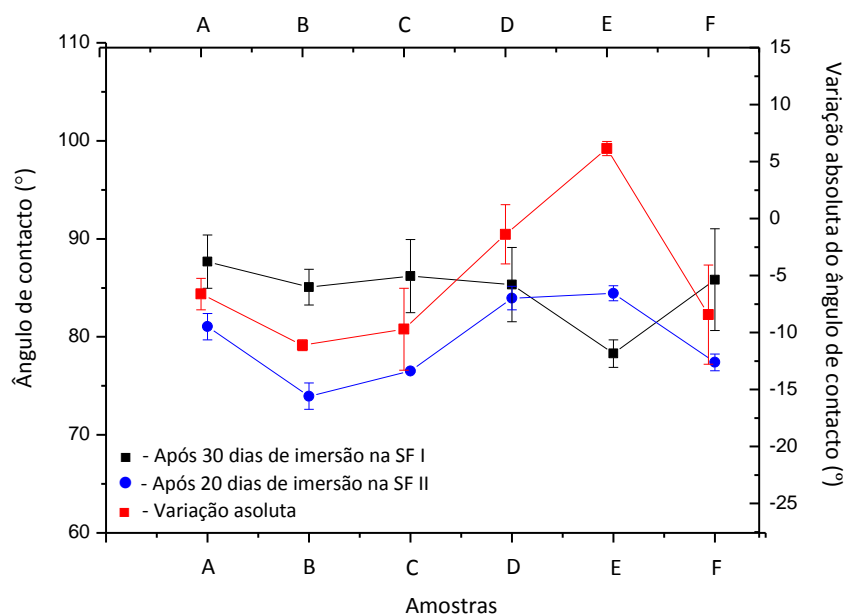
### 3.1.3. Molhabilidade

As medições do ângulo de contacto das amostras após estas duas novas imersões encontram-se representadas nos gráficos das figuras 39 e 40.



**Figura 39** - Gráfico ilustrativo da variação absoluta dos ângulos de contacto obtida para as várias amostras (A' a F'), após 10 dias de imersão na solução fisiológica II. SF I – Solução fisiológica I; SF II – Solução fisiológica II.

Através da análise do gráfico da figura 39 é possível auferir que relativamente às amostras imersas na solução fisiológica por um período de 10 dias não se verificou uma variação significativa do ângulo de contacto das mesmas. Podemos, igualmente, verificar que, contrariamente às restantes, as amostras E' e F' apresentaram um aumento do seu ângulo de contacto, ou seja, tornaram-se menos hidrofílicas. Tal facto pode indiciar que os locais de dissolução existentes na superfície destas amostras se encontram saturados, não existindo mais locais possíveis para a dissolução de compostos na superfície destas amostras.



**Figura 40** - Gráfico ilustrativo da variação absoluta dos ângulos de contacto obtida para as várias amostras (A a F), após 20 dias de imersão na solução fisiológica II. SF I – Solução fisiológica I; SF II – Solução fisiológica II.

O gráfico da figura 40 relaciona a variação absoluta dos ângulos de contacto das amostras imersas na solução fisiológica II por um período de 20 dias. Assim, podemos verificar que, à exceção da amostra E, todas as amostras apresentam uma diminuição do seu ângulo de contacto, ou seja, tornam-se mais hidrofílicas em consequência do aumento do número de terminações em O, possivelmente devido à adsorção da proteína BSA, bem como de outros elementos pertencentes à solução, na superfície destas amostras. A amostra B foi aquela que apresentou uma maior variação do seu ângulo de contacto (-12°). Por fim, é possível constatar que o ângulo de contacto da amostra E sofreu uma variação de cerca de 10°, ou seja, tornou-se menos hidrofílica, o que sugere a saturação da sua superfície. Desta forma, podemos concluir que a amostra E apresenta uma maior tendência para adsorver iões à superfície quando comparada com as restantes amostras em estudo, acabando por saturar mais rapidamente. Esta situação é apoiada pela análise EDS, uma vez que se verificou a presença de determinados elementos, nomeadamente, o Ca, o Na, o P, o O e o S para a amostra E.

Os gráficos das figuras 39 e 40 permitem assim concluir que as características iniciais da superfície são mais importantes do que o tempo de imersão das amostras. De facto, as superfícies que estiveram imersas em regime estático durante 30 dias na solução fisiológica I saturaram mais rapidamente do que as que estiveram no regime dinâmico, mesmo que estas últimas tenham estado imersas o dobro do tempo.

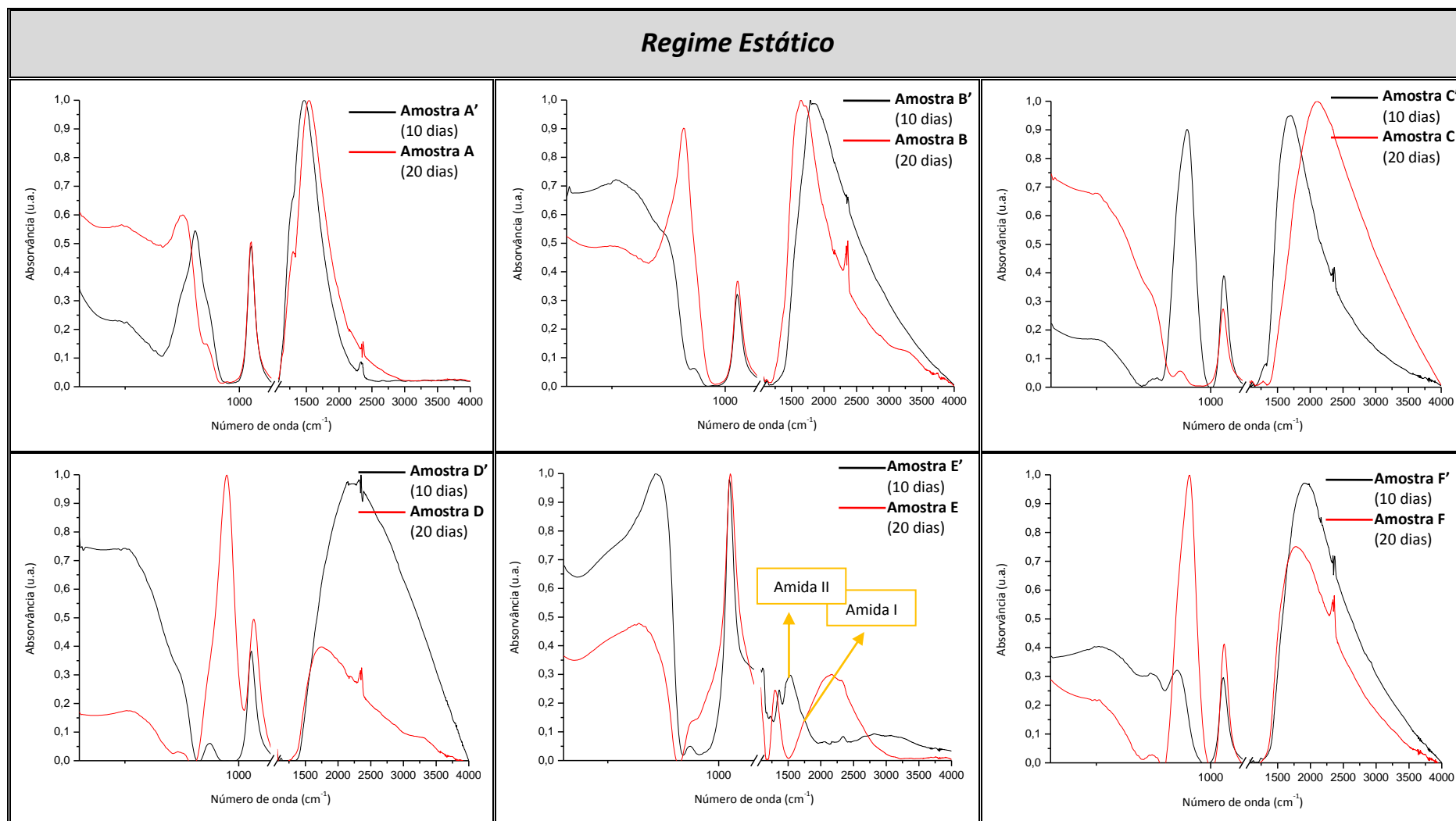
#### **3.1.4. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Por fim, os gráficos FTIR obtidos nas amostras submetidas aos ensaios de imersão na solução fisiológica II por um período de 10 e 20 dias encontram-se ilustrados na figura 41.

Analisando os gráficos FTIR da figura 41 podemos observar as variações de absorção no Infravermelho presentes nas amostras submetidas a períodos de 10 e 20 dias de imersão na solução fisiológica II, em regime estático. Tal como na análise efetuada no ponto 2.1.5. é possível observar a existência de uma banda larga associada às ligações do substrato no intervalo  $650\text{--}850\text{ cm}^{-1}$ . Com exceção das amostras A'/A e C'/C, a referida banda apresenta uma diminuição de intensidade, à medida que o tempo de imersão aumenta. O facto das amostras A'/A e C'/C não apresentarem uma diminuição da banda pode ser justificado pelo facto de a superfície das amostras, antes da sua colocação na solução fisiológica II, já se encontrar modificada, em virtude dos ensaios de imersão de 30 dias. Nestes gráficos é possível verificar ainda a presença de uma banda bastante intensa no intervalo  $910\text{--}950\text{ cm}^{-1}$  para as amostras D'/D e F'/F, contudo, praticamente inexistente na amostra E'/E. De acordo com o que já foi desenvolvido, esta banda está relacionada com vibrações bending do grupo  $\text{--OH}$ , muito provavelmente com origem no OH incluído na solução SBF. Só assim se entende como esta banda surge e desaparece nos espetros FTIR, após as sucessivas lavagens com água destilada entre as várias etapas de imersão. Tal como foi verificado no ponto 2.1.5., não houveram grandes variações relativamente à superfície das amostras no que às absorções no Infravermelho no

intervalo entre os 1200-4000  $\text{cm}^{-1}$  diz respeito. Mais uma vez, com exceção das amostras E'/E, não foi possível observar os picos da Amida I (1650  $\text{cm}^{-1}$ ) e Amida II (1540  $\text{cm}^{-1}$ ) pertencentes à proteína BSA [74].

Contudo, a presença destas bandas e consequentemente da proteína, nas restantes amostras, não é de excluir, visto que a enorme banda de absorção entre os 1500-4000  $\text{cm}^{-1}$  camufla eventuais sinais em torno dos 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$ . De facto, de todas as amostras estudadas, as amostras E'/E são as únicas que evidenciam as bandas características dos grupos amida da proteína BSA: a amida I resultante da interação das vibrações de elongação C=O e C–N e observada em torno dos 1650  $\text{cm}^{-1}$  e a amida II resultante da interação das vibrações de elongação C–N e as vibrações bending N–H, observada a 1540  $\text{cm}^{-1}$ . Comprova-se assim, de forma inequívoca, que a adsorção da proteína ocorre essencialmente nas amostras E'/E, mas apenas ao fim de 30 dias.



**Figura 41** – Gráficos FTIR referentes às amostras A'/A, C'/C, D'/D, E'/E e F'/F, após os ensaios de imersão de 10 e 20 dias na solução fisiológica II.



### 3.1.5. Caracterização elétrica

Existem diversos fatores que influenciam o comportamento elétrico dos filmes de diamante dopados com boro, nomeadamente:

- Concentração de boro na rede cristalina;
- Tipo de terminações presentes na própria superfície;
- Presença de fases não-diamante ( $sp^2$ );
- Orientação cristalográfica [76].

Assim, foram realizadas medidas da resistência elétrica das amostras. Na tabela 12 são apresentados os valores da resistência elétrica inicial, após 10 e 20 dias de imersão na solução fisiológica II.

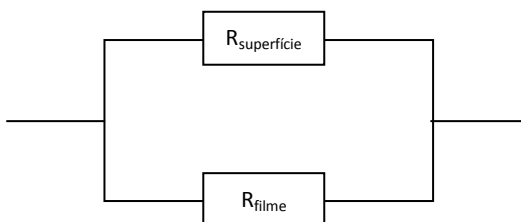
**Tabela 12** - Tabela ilustrativa dos valores de resistência elétrica (inicial, após 30+10 e 30+20 dias de imersão) das amostras em estudo.

<b>Resistência elétrica (R)</b>				
<b>Amostra</b>	<b>30 + 10 dias</b>	<b>Inicial</b>	<b>30 + 20 dias</b>	<b>Amostra</b>
<b>A'</b>	14 k $\Omega$	14,21 k $\Omega$	13,86 k $\Omega$	<b>A</b>
<b>B'</b>	1,80 x 10 <sup>4</sup> k $\Omega$	2,04 x 10 <sup>4</sup> k $\Omega$	1,63 x 10 <sup>4</sup> k $\Omega$	<b>B</b>
<b>C'</b>	338,3 k $\Omega$	328 k $\Omega$	209,05 k $\Omega$	<b>C</b>
<b>D'</b>	2,26 x 10 <sup>4</sup> k $\Omega$	2,23 x 10 <sup>4</sup> k $\Omega$	2,24 x 10 <sup>4</sup> k $\Omega$	<b>D</b>
<b>E'</b>	2,07 x 10 <sup>4</sup> k $\Omega$	2,04 x 10 <sup>4</sup> k $\Omega$	1,76 x 10 <sup>4</sup> k $\Omega$	<b>E</b>
<b>F'</b>	2,12 x 10 <sup>4</sup> k $\Omega$	2,17 x 10 <sup>4</sup> k $\Omega$	2,13 x 10 <sup>4</sup> k $\Omega$	<b>F</b>

Através da análise dos valores descritos na tabela 12 verifica-se que as amostras A e C são aquelas que apresentam os menores valores de resistência elétrica, quando comparadas com as restantes amostras. De facto, experimentalmente verifica-se que a diminuição da R ocorre com o aumento da cristalinidade [82]. Assim, quanto maior é a qualidade cristalina, mais fácil é a incorporação de B na rede do diamante e

consequentemente maior é a condutividade elétrica dos filmes. Assim, compreende-se porque é que a amostra A é a mais condutora, dado que apresenta maior tamanho de cristalite e maior FOM (tabelas 8 e 10). Relativamente às amostras NCD, apesar de terem sido depositadas com parâmetros relativamente diferentes (tabela 4), não se observa uma variação significativa na resistência elétrica. De facto, de acordo com as referidas tabelas, tanto o tamanho médio de cristalite como os valores de FOM são bastante semelhantes. Consequentemente, a incorporação de B em lugares substitucionais da rede, nestas amostras, é bastante limitada. Neste sentido, é imperativo estudar o comportamento elétrico das amostras antes e após o contacto destas com um determinado meio. A presença de diversos iões nas superfícies de diamante pode influenciar a condutividade destas através de eventuais ligações a grupos funcionais presentes na superfície e/ou a simples adesão de espécies iónicas.

Após as duas etapas de imersão das amostras na solução fisiológica observa-se, de um modo geral, uma diminuição da resistência elétrica. Contudo, com exceção das amostras B, C e E, essa variação é tão pequena que pode ter origem em heterogeneidades das superfícies das amostras. De facto, é de esperar que tais superfícies apresentem certas heterogeneidades na dopagem (zonas mais ou menos dopadas com boro), devido à realização das deposições sem rotação do substrato. Já as variações mais significativas observadas nas amostras B, C e E podem resultar da acumulação de espécies iónicas na superfície. Assim, a presença destes iões à superfície das amostras justifica um aumento da condutividade superficial, mesmo que a condutividade do filme se mantenha constante. Podemos assim encarar o conjunto filme/superfície como uma associação de resistências em paralelo (figura 42):



**Figura 42** - Figura ilustrativa da associação de resistências em paralelo.

Onde:

$$R_{\text{total}} = \frac{R_{\text{filme}} \times R_{\text{superfície}}}{R_{\text{filme}} + R_{\text{superfície}}}$$

Assim, uma diminuição da  $R_{\text{superfície}}$  origina uma diminuição da  $R_{\text{total}}$  da amostra. Concluindo, as medidas elétricas mostraram que as amostras B, C e E apresentaram maior alteração da sua condutividade superficial como resultado da maior acumulação de espécies iónicas, devido ao contacto com a solução fisiológica.

## **Capítulo IV**

---

### **Conclusões e trabalho futuro**

No presente trabalho foram desenvolvidas diversas superfícies de diamante dopadas com boro, com diferentes morfologias e microestruturas, através da técnica de deposição química em fase de vapor assistida por filamento quente (HFCVD), em substratos cerâmicos à base de nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ). Verificou-se que, consoante as condições de deposição empregues, obtêm-se superfícies com diferentes graus de oxidação (mistura de terminações em H e em O). Esta situação é particularmente inédita visto que não seria de esperar a obtenção de tais superfícies em atmosferas redutoras como as utilizadas neste tipo de reatores. Conclui-se pois que a utilização de óxido de boro e de etanol, durante o procedimento de dopagem, fornece o oxigénio suficiente para originar este tipo de superfícies. Assim, tais superfícies revelaram-se bastante mais heterogêneas do que se previa aumentando, desta forma, a diversidade de características que podem influenciar a degradação destas.

Posteriormente, estas superfícies foram colocadas numa solução fisiológica de SBF (*simulated body fluid*) com duas concentrações da proteína BSA (*bovine serum albumin*), durante diversos períodos de tempo (10, 20 e 30 dias), em regime de imersão estático e dinâmico. As superfícies de diamante que apresentam maior tendência para adsorção de iões (em particular o Na, o P, o S, o Ca, o Cl, o K e o Mg) são as que possuem maior rugosidade e maior grau de oxidação. Os resultados do ângulo de contacto permitem concluir que as terminações presentes na superfície dos filmes de diamante são decisivas, influenciando fortemente a adesão de proteínas e a deposição de espécies iónicas na superfície das amostras. Contudo, foi possível constatar que a rugosidade não exerce uma grande influência na degradação da superfície dos filmes de diamante. Os resultados da difração de raios-X sugerem que as espécies adsorvidas se encontram em fase amorfa, não se detetando quaisquer evidências da formação de apatites.

Por outro lado, a análise comparativa dos dois regimes em estudo (estático e dinâmico), permite concluir que a adsorção da proteína BSA e a deposição de espécies iónicas nas superfícies apresentam menor tendência para a adesão destes elementos quando em regime dinâmico. Conclui-se que o fluxo reduz o processo de degradação das superfícies. Tal facto acaba por se tornar bastante positivo, visto que este regime é aquele que simula efetivamente uma situação real, a circulação sanguínea, tornando

assim possível aumentar o tempo de permanência destas superfícies em meios fisiológicos.

As medidas da resistência elétrica das amostras, realizadas antes e após os ensaios de imersão no regime estático, evidenciam alterações da condutividade superficial de algumas superfícies, em amostras com características iniciais bastante distintas. Apesar de não se ter realizado um estudo detalhado sobre este problema, podemos concluir que esta alteração da condutividade superficial resulta do contacto de espécies iónicas depositadas na superfície das amostras. Este facto comprova, que as superfícies de diamante NCD e MCD dopadas com boro e desenvolvidas neste trabalho, não são bio-inertes, contrariando assim os estudos anteriormente realizados.

Tendo em conta que algumas das superfícies de diamante, aqui estudadas, apresentam deficiências na homogeneidade morfológica e elétrica, seria importante tentar suprimir estas falhas em estudos subsequentes. Uma possibilidade seria aperfeiçoar o próprio processo de riscagem das superfícies, de forma a garantir maior densidade de nucleação para a fase diamante na superfície dos substratos cerâmicos. Outra possibilidade podia passar pela deposição de filmes de diamante em substratos em rotação, durante o processo CVD. Desta forma seria possível mitigar alterações na morfologia e na dopagem das referidas superfícies. Outro aspeto igualmente importante, que podia ser abordado em trabalhos futuros, seria o aperfeiçoamento da técnica que origina a formação das terminações em H e em O nas superfícies de diamante. Para tal poder-se-ia recorrer a tratamentos químicos e físicos, das referidas superfícies, já estabelecidos, como forma de garantir superfícies quase que exclusivamente terminadas em H e em O.



## **Bibliografia**

---



- [1] K.L. Moore, A.F. Dalley, *Anatomia orientada para a clínica*, 4ª Edição, Guanabara Koogan S.A., (2001) pp. 28-32.
- [2] G. Tortora and B. Derrickson, *Principles of Anatomy and Physiology*, 12th ed. John Wiley & Sons, Inc, (2009) pp. 689-695; 760-775.
- [3] C. Gonçalves, V. Bairos, *Histologia, Texto e Imagens*, 3ª Edição, Imprensa da Universidade de Coimbra, (2010) pp. 47-55.
- [4] A.C. Guyton, J.E. Hall, *Textbook of Medical Physiology*, 11th Edition, Elsevier Saunders, (2006) pp. 161-170.
- [5] W.F. Boron, E.L. Boulpaep, *Medical Physiology*, Elsevier Saunders, (2005) pp. 423-482.
- [6] W. Gallagher. FTIR Analysis of Protein Structure.
- [7] C.A. Haynes, W. Norde, *Biointerfaces*, 2 (1994) 517.
- [8] N. A. Draeger, Bjorksten, bit 7.
- [9] V. Hlady, J. Buijs, Protein adsorption at solid surfaces, *Current opinion in biotechnology*, vol. 7 (1996) pp. 72.
- [10] S. Lousinian, S. Kassavetis, S. Logothetidis, *Diamond & Related Materials*, 16 (2007) 1868-1874.
- [11] J.J. Ramsden, D.M. Allen, D.J. Stephenson, J.R. Alcock, G.N. Peggs, G. Fuller, G. Goch, *Annals of the CIRP*, 56 (2007) 687.
- [12] A. Qureshi, Y. Gurbuz, M. Howell, W.P. Kang, J.L. Davidson, *Diamond & Related Materials*, 19 (2010) 457.
- [13] D. F. Williams, *Biomaterials*, 29 (2008) 2941–2953.
- [14] P. Vadgama, *Surfaces and interfaces for biomaterials*, CRC Press LLC, (2005) pp. 105-108.
- [15] D.F. Williams, *Definitions in biomaterials*, Elsevier (1987).
- [16] B.D. Malhotra, A. Chaubey, *Sensors and Actuators*, B 91 (2003) 117–127.
- [17] .S. Belluzo, M.É. Ribone, C.M. Lagier, *Sensors*, 8 (2008) 1366-1367.
- [18] F.Davis, S.P.J. Higson, *Tissue engineering using ceramics and polymers*, (2007) 1-42.
- [19] S.K. Sharma, N. Sehgal, A. Kumar, *Current Applied Physics*, 3 (2003) 307-316.
- [20] A. Qureshi, Y. Gurbuz, M. Howell, W.P. Kang, J.L. Davidson, *Diamond & Related Materials*, 19 (2010) 457–461.

- [21] M.M.R. Boom, J. Korf, K. Venema, G. Urban, P. Vadgama, *Biosensors & Bioelectronics*, 16 (2001) 839-847.
- [22] W. Kulisch, C. Popov, D. Gilliland, G. Ceccone, J.P. Reithmaier, F. Rossi, *Surface & Coatings Technology*, Article in Press.
- [23] B. Rezek, E. Ukraintsev, L. Michalíková, A. Kromka, J. Zemek, M. Kalbacova, *Diamond & Related Materials*, 18 (2009) 918.
- [24] F. Beck, W. Kaiser, H. Krohn, *Electrochimica, Acta* 45 (2000) 4691.
- [25] G. Cicala, P. Bruno, F. Bénédict, F. Silva, K. Hassouni, G.S. Senesi, *Diamond and Related Materials*, 14 (2005) 421.
- [26] M. Schwander, K. Partes, *Diamond & Related Materials*, 20 (2011) 1287–1301.
- [27] C. Popov, W. Kulisch, J.P. Reithmaier, T. Dostalova, M. Jelinek, N. Anspach, C. Hammann, *Diamond & Related Materials*, 16 (2007) 735–739.
- [28] Y. Gurbuz, O. Esame, I. Tekin, W.P. Kang, J.L. Davidson, *Solid-State Electronics*, 49 (2005) 1055-1070.
- [29] P. Villalba, M.K. Ram, H. Gomez, A. Kumar, V. Bhethanabotla, A. Kumar, *Materials Science and Engineering C*, 31 (2011) 1115–1120.
- [30] J. Zhang, J.W. Zimmer, R.T. Howe, R. Maboudian, *Diamond & Related Materials*, 17 (2008) 23–28.
- [31] Z.L. Wang, C. Lu, J.J. Li, C.Z. Gu, *Diamond & Related Materials*, 18 (2009) 132-135.
- [32] W. Kulisch, C. Popov, *Phys. Stat. Sol. (a)*, 2 (2006) 203.
- [33] S.J. Bull, *Diamond and Related Materials*, 4 (1995) 827.
- [34] F.P. Bundy, H.T. Hall, H.M. Strong, R.H. Wentorf, *Nature*, 176 (1955) 51.
- [35] K.L. Choy, *Progress in Materials Science*, 48 (2003) 57-170.
- [36] G. Soto, G. Silva, O. Contreras, *Surface & Coatings Technology*, 201 (2006) 2733–2740.
- [37] J.E. Butler, R.L. Woodin, L.M. Brown, P. Fallon, *Philos. Trans. Phys. Sci. Eng.* 342, (1993) 1664.
- [38] Anthony T.R., *Diamond and Related Materials*, 6 (1997) 1707-1715.
- [39] Y.K. Kim, K.H. Lee, M.J. Lee, J.Y. Lee, *Thin Solid Films*, 341 (1999) 211-215.

- [40] E. Anger, A. Gicquel, Z.Z. Wang, M.F. Ravet, *Diamond and Related Materials*, 4 (1995) 759-764.
- [41] C.J. Tang, A.J. Neves, A.J.S. Fernandes, *Diamond and Related Materials*, 12 (2003) 1488.
- [42] G. Cicala, P. Bruno, F. Bénédic, F. Silva, K. Hassouni, G.S. Senesi, *Diamond and Related Materials*, 14 (2005) 421.
- [43] S. Yugo, T. Kanai, T. Kimura, *Science and Technology of New Diamond*, (1990) 119.
- [44] Liu Y.K., Tso P.L., Lin I.N., Tzeng Y., Chen Y.C., *Diamond and Related Materials*, 15 (2006) 234-238.
- [45] V.J. Trava-Airoldi, E.J. Corat, V. Baranauskas, *Key Eng. Mater.* (1998) 138-140: 195-244.
- [46] A. Tallaire, “Deposição de diamante CVD sobre nitreto de silício por filamento quente” Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro, Aveiro (2002).
- [47] R. Barros et. al., *Quim. Nova*, 28 (2005) 317.
- [48] A. Kraft et al., *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2 (2007) 355.
- [49] Y. Nakamura, S. Sakagami, Y. Amamoto, Y. Watabe, *Thin Solid Films*, 308-309 (1997) 249.
- [50] Qi Hua Fan, “Diamond growth on metals” Tese de Doutorado, Departamento de Física, Universidade de Aveiro, Aveiro (1998).
- [51] E. Cappelli, L. Esposito, F. Pinzaria, G. Matteia, S. Orlando, *Diam. Relat. Mater.*, 11 (2002) 1731.
- [52] R.M. Chrenko, *Phys. Rev. B* 7 (1993) 4560.
- [53] R. Kue, A. Sohrabi, D. Nagle, C. Frondoza, D. Hungerfor, *Biomaterials*, 20 (1999) 1195.
- [54] P.R. Hernández, C. Taboada, L. Leija, V. Tsutsumi, B. Vázquez, F. Valdés-Perezgasga, J.L. Reyes, *Sensors and Actuators*, B 46 (1998) 133.
- [55] G.L. De Poorter, T.K. Brog, M.J. Readey, *Structural ceramics*. Em: *ASM International Handbook*. v.2. “Properties and selection: nonferrous alloys and special-purpose materials” Materials Park: American Society for Metals, (1990).

- [56] P.W. May, W.J. Ludlow, M. Hannaway, P.J. Heard, J.A. Smith, K.N. Rosser, *Diamond & Related Materials*, 17 (2008) 105.
- [57] Y. Einaga, G.S. Kim, S.G. Park, A. Fujishima, *Diamond and Related Materials*, 10 (2001) 306.
- [58] J. Zhao, D. Wu, J. Zhi, *Journal of Electroanalytical Chemistry* (2008), article in press.
- [59] M.A. Neto, E.L. Silva, C.A. Ghumman, O.M. Teodoro, A.J.S. Fernandes, F.J. Oliveira, R.F. Silva, *Thin Solid Films*, Submitted to Publication.
- [60] C. Popov, W. Kulisch, M. Jelinek, A. Bock, J. Strnad, *Thin Solid Films*, 494 (2006) 92.
- [61] A. Oyane, H.M. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki, T. Nakamura, Wiley Periodicals, Inc. (2003) 188.
- [62] V. Meynen, P. Cool, E.F. Vansant, *Microporous and Mesoporous Materials*, 125 (2009) 170–223.
- [63] D.S. Knight, W.B. White, *J. Mater. Res.* 4 (1989) 385.
- [64] W.A. Yarbrough, R. Messier, *Science*, 247 (1990) 688.
- [65] L.H. Robins, E.N. Farabaugh, A. Feldman, *J. Mater. Res.* 5 (1990) 2456.
- [66] I.P. Hayward, K.J. Baldwin, D.M. Hunter, D.N. Batchelder, G.D. Pitt, *Diamond. Relat. Mater.* 4 (1995) 617.
- [67] A. C. Ferrari, J. Robertson, *Physical Review B*, Vol 63 (2001).
- [68] L. Fayette, B. Marcus, M. Mermoux, L. Abello, G. Lucazeau, *Diamond and Related Materials*, 3 (1994) 438.
- [69] H. Kuzmany, R. Pfeiffer, N. Salk, B. Günther, *Carbon*, 42 (2004) 911–917.
- [70] S.M. Leeds, T.J. Davis, P.W. May, C.D.O. Pickar, M.N.R. Ashfold, *Diamond and Related Materials*, 7 (1998) 233-237.
- [71] K. Teii, T. Ikeda, *Diamond & Related Materials*, 16 (2007) 753 – 756.
- [72] A. Stanishevsky, S.A. Catledge, Y. Vohra, *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, 37/2 (2009) 348 – 353.
- [73] A.P. Serro, A.C. Fernandes, B. Saramago, J. Lima, M.A. Barbosa, *Biomaterials*, 18 (1997) 963 – 968.
- [74] V. Militello, C. Casarino, A. Emanuele, A. Giostra, F. Pullara, M. Leone, *Biophysical Chemistry*, 107 (2004) 175 – 187.

- [75] J.A. Juhasz, S.M. Best, A.D. Auffret, W. Bonfield, *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, 19 (2008) 1823 – 1829.
- [76] S. Szunerits, M. Mermoux, A. Crisci, B. Marcus, P. Bouvier, D. Delabouglise, J.P. Petit, S. Janel, R. Boukherroub, L. Tay, *J. Phys. Chem. B*, 110 ( 2006) 23888-23897.
- [77] J. Xu, Z. Hou, X. Tang, J. Cheng, T. Li, *Microscopy Research and Technique*, 74 (2011) 1076-1082.
- [78] H.J. Butt, B. Cappella, M. Kappl, *Surface Science Reports*, 59 (2005) 1-152.
- [79] Y.F. Zhang, F. Zhang, Q.J. Gao, X.F. Peng, Z.D. Lin, *Diamond and Related Materials*, 10 (2001) 1523-1527.
- [80] M. Amaral, A.J.S. Fernandes, M. Vila, F.J. Oliveira, R.F. Silva, *Diamond and Related Materials*, 15 (2006) 1822-1827.
- [81] A.J.S. Fernandes, M.A. Neto, F.A. Almeida, R.F. Silva, F.M. Costa, *Diamond & Related Materials*, 16 (2007) 757–761.
- [82] W. Gajewski, P. Achatz, O. A. Williams, K. Haenen, E. Bustarret, M. Stutzmann, and J. A. Garrido, *Physical Review, B* 79, (2009) 045206.
- [83] T. Zhang, J. Zhang, B. Shen, F. Sun, *Journal of Crystal Growth*, 343 (2012) 55–61.
- [84] A. Wang, K. Lee, C. Sun, L. Wen, *J. Mater. Sci. Technol.*, Vol.22 No.5, (2006) 599-604.
- [85] M. Wang, N. Simon, C.D. Pascanut, M. Bouttemy, A. Etcheberry, M. Li, R. Boukherroub, S. Szunerits, *Electrochimica Acta* 54, (2009) 5818-5824.